

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Trabajo Final de Graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como
requisito para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

**Evaluación de la sobrevivencia de probióticos, adición de inulina y estabilidad
de betalainas para el potencial desarrollo de una bebida probiótica de pitahaya**

Daniela Barahona Pereira

Carné: B50831

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

San José, Costa Rica

Junio, 2022

Tribunal Examinador

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

Elaborado por:

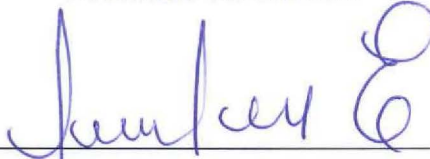
Daniela Barahona Pereira

Aprobado por:



M.Sc. Ana Lucía Mayorga Gross

Presidente del Tribunal



M.Sc. Laura Esquivel Arroyo

Directora del proyecto



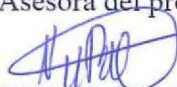
Ph.D. Jessie Usaga Barrientos

Asesora del proyecto



Ph.D. Patricia Esquivel Rodríguez

Asesora del proyecto



Ph.D. Natalia Barboza Vargas

Profesora Designada

Dedicatoria

A mi mamá y mi hermano,
mi equipo.

Agradecimientos

A mi mamá, por madrugar conmigo cuando lo necesitaba, por celebrar cada triunfo y llorar conmigo cada tropiezo, por nunca cortarme las alas y dejarme disfrutar esta etapa a plenitud, hay infinitas cosas por las cuales agradecerte, pero principalmente, por todas las cosas que solo vos sabes que hiciste para darme la oportunidad de estudiar, este logro es nuestro.

A mi hermano, la vida me dio la bendición de tener el mejor compañero de vida desde que nací, gracias por escuchar cada dato curioso de mis cursos y de la tesis, gracias por acompañarme a lo largo de estos años cuidándome y apoyándome en todo momento, gracias por siempre creer en mí aun cuando yo no lo hacía.

A mis abuelitos, gracias por tenerme siempre en sus oraciones, por los chineos y las palabras de amor y motivación, por haber estado presente desde el inicio de mi vida como estudiante y ser parte de mi formación como ser humano.

A mis tías, Marcia, gracias por ser mi apoyo emocional, mi consejera, cómplice y amiga; Daph, gracias por llegar completar mi familia y por ganarte el espacio de tía en mi vida. A mi tío, Paulo, gracias por ser incondicional y por estar siempre que te necesito.

A Giuli, por las pijamadas, conversaciones, paseos, reportes y laboratorios juntas, por una amistad para toda la vida.

A Andre, gracias por las horas de estudio por FaceTime, por tu sabiduría y consejos, gracias por tu amistad que tanto valoro.

A Tati, gracias por darme posada en tantas ocasiones, por las comidas compartidas y las charlas a toda hora, por ser la mejor roomie.

A Juli, por nuestras pijamadas de estudio para termo con mucha comida y risas hasta llorar, gracias por tu amistad y tus mensajes repentinos y llenos de amor.

A Moni, gracias por ser la que ha capturado los mejores recuerdos, por ser el alma de la fiesta y siempre estar dispuesta a ayudar.

A Dani Q, gracias por todas las risas compartidas y la amistad que nos queda.

A Sau y Fulvi, gracias por ser mis primeros amigos de la U, por ser tan incondicionales y detallistas.

A Enma, gracias por formar parte de los recuerdos más lindos que tengo en esta etapa de mi vida y por llegar para quedarte en ella.

A Nana, gracias por una amistad de años que se volvió familia, compartiendo etapas diferentes, pero siempre juntas, dito.

A mis profesoras Laura, Jessie y Patricia, para mí fue un honor cerrar esta etapa realizando este proyecto en equipo con ustedes, gracias por el acompañamiento y apoyo en este proceso.

A Leidy, Luis, Laura y Vanny, gracias por el apoyo y la disponibilidad durante las pruebas experimentales, fueron clave fundamental durante esta tesis.

Índice

Tribunal Examinador	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Índice de Figuras	vi
Índice de cuadros.....	vii
Índice de abreviaturas	viii
Resumen.....	ix
1. Justificación	11
2. Marco teórico	14
2.1 Probióticos	14
2.1.1 Definición.....	14
2.1.2 Criterios de selección	14
2.1.3 Fuentes de probióticos	15
2.1.4 Beneficios para la salud	15
2.1.5 Prebióticos.....	16
2.2 Tendencias de consumo de bebidas no lácteas.....	16
2.2.1 Alimentos funcionales: generalidades y mercado.....	17
2.2.3 Probióticos en productos lácteos vs productos no lácteos.....	17
2.2.4 Limitaciones de probióticos en matrices no lácteas.....	18
2.3 Pitahaya.....	19
2.3.1 Características generales	19
2.3.2 Producción y comercialización de pitahaya en Costa Rica.....	20
2.3.3 Pitahaya como alimento funcional	20
2.4 Betalaínas	21
2.4.1 Betalaínas	21
2.4.2 Betacianinas	22
2.4.3 Betaxantinas	22
2.4.4 Beneficios para la salud de las betalaínas	22
2.4.5 Métodos de identificación.....	23
3. Objetivos	23
3.1 Objetivo general.....	23
3.2 Objetivos específicos	23

4. Materiales y métodos	23
4.1 Localización del trabajo	23
4.2 Elaboración del jugo de pitahaya	24
4.3 Preparación de probióticos e inoculación.....	24
4.4 Métodos de análisis	24
4.4.1 Recuento de microorganismos probióticos	24
4.4.2 Determinación de la concentración de betalaínas	25
4.4.3 Determinación del pH	25
4.4.4 Determinación de color	25
4.4.5 Determinación de sólidos solubles	26
4.5 Diseño experimental y análisis estadístico	26
4.5.1 Objetivo 1: <i>Evaluación de la sobrevivencia de dos microorganismos probióticos seleccionados en un jugo de pitahaya a través del tiempo de almacenamiento</i>	26
4.5.2 Objetivo 2: <i>Evaluación el efecto de la adición de inulina en la sobrevivencia del microorganismo probiótico que mejor se adaptó en jugo de pitahaya a través del tiempo.</i> 27	
4.5.3 Objetivo 3: <i>Cuantificación del contenido de betalaínas en un jugo de pitahaya inoculado con los probióticos comerciales durante su almacenamiento en refrigeración para determinar la estabilidad de estos compuestos bioactivos.</i>	28
5. Resultados y discusión	29
Objetivo 1: <i>“Evaluar la sobrevivencia de dos microorganismos probióticos seleccionados en un jugo de pitahaya a través del tiempo de almacenamiento”</i>	29
Objetivo 2: <i>“Evaluar el efecto de la adición de inulina en la sobrevivencia del microorganismo probiótico que mejor se adaptó en jugo de pitahaya a través del tiempo.”</i> 32	
Objetivo 3: <i>“Cuantificación del contenido de betalaínas en un jugo de pitahaya inoculado con los probióticos comerciales durante su almacenamiento en refrigeración para determinar la estabilidad de estos compuestos bioactivos.”</i>	36
6. Conclusiones	41
7. Recomendaciones.....	41
8. Bibliografía	42
9. Anexos	56

Índice de Figuras

Figura 1. Estructura del ácido betalámico (a), betaxantinas (b) y betacianinas (c) (Flores-Mancha <i>et al.</i> , 2019)	21
Figura 2. Cinética de sobrevivencia de <i>L. rhamnosus</i> LGG® y <i>L. casei</i> 431 en jugo de pitahaya almacenado a 5 °C durante el tiempo con un n=3.....	30
Figura 3. Población de <i>L. rhamnosus</i> LGG® en jugo de pitahaya con y sin inulina (control) almacenado a 5 °C durante 23 días con un n=3.....	32
Figura 4. Inversión en caliente del jugo de pitahaya durante tratamiento térmico.....	56
Figura 5. Recuento de las diluciones 10 ⁻⁴ y 10 ⁻⁵ de <i>L. rhamnosus</i> LGG® en el día 14 de la segunda repetición del objetivo 2.	57
Figura 6. Microfiltración del jugo de pitahaya con filtro de 0,2 µm en viales para análisis de betalaínas en HPLC	58

Índice de cuadros

Cuadro I. Composición nutricional de 100 g de porción comestible de pitahaya <i>Hylocereus</i> spp.....	19
Cuadro II. Características fisicoquímicas de pH y sólidos solubles del jugo de pitahaya con inulina y el control (sin inulina) inoculados con el probiótico <i>L. rhamnosus</i> LGG® durante el almacenamiento a 5 °C	34
Cuadro III. Color del jugo de pitahaya con inulina y el control (sin inulina) inoculados con el probiótico <i>L. rhamnosus</i> LGG® durante el almacenamiento a 5 °C	35
Cuadro IV. Contenido de betalaínas en jugo de pitahaya inoculado con los probióticos <i>L. rhamnosus</i> LGG ®, <i>L. casei</i> 431 y control (jugo de pitahaya sin inocular) durante el almacenamiento a 5°C	37
Cuadro V. Contenido de las betalaínas totales y las principales del jugo de pitahaya con inulina y el control (sin inulina) inoculados con el probiótico <i>L. rhamnosus</i> LGG® durante el almacenamiento a 5 °C	38

Índice de abreviaturas

%: Porcentaje

ϵ = coeficiente de extinción molar: betaninas 60000 L/mol*cm

μm : micra

ANDEVA: Análisis de varianza

CITA: Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de alimentos

E162: colorante natural proveniente de la betanina

FAO: Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)

g: gramo

GRAS: Generally Recognized as Safe (Generalmente reconocido como seguro)

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficiencia)

kg: kilogramo

***L. casei* 431:** *Lactobacillus paracasei* 431

***L. rhamnosus* LGG®:** *Lactobacillus. rhamnosus* LGG®

mg: miligramo

mL: mililitro

nm: nanómetro

OMS: Organización Mundial de la Salud

PROCOMER: Promotora del Comercio Exterior de Costa Rica

RTCR: Reglamento Técnico Costa Rica

UFC/mL: Unidades formadoras de colonia por mililitro

v/v: concentración volumen volumen

Resumen

Barahona Pereira, Daniela.

Evaluación de la sobrevivencia de probióticos, adición de inulina y estabilidad de betalaínas para el potencial desarrollo de una bebida probiótica de pitahaya

Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. San José, Costa Rica.

D. Barahona P., 2022. 58 p: 6 il. 109 refs.

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la sobrevivencia de dos microorganismos probióticos, el efecto de la adición de inulina y la estabilidad de las betalaínas en jugo de pitahaya para valorar el uso potencial de esta materia prima en la elaboración de una bebida probiótica.

Se eligieron dos microorganismos probióticos: *Lactobacillus rhamnosus* LGG® y *Lactobacillus paracasei* 431, cuyos beneficios en la salud y propiedades funcionales están científicamente comprobados. Cada uno se inoculó en 11 UFC/mL a 200 mL de jugo de pitahaya comercialmente estéril. Se seccionaron muestras individuales de 15 mL en tubos de ensayo para realizar muestreos a través del tiempo, los tubos fueron almacenados a 5 °C. Durante cada punto de muestreo se determinó la concentración del probiótico por medio de montaje en Petrifilm y se realizó hasta el día en el que la concentración fuera de 9 logaritmos (UFC/mL). En el caso de *Lactobacillus paracasei* 431, la concentración fue de 9 logaritmos (UFC/mL) a los 0,37 días mientras que para *L. rhamnosus* LGG® a los 7,95 días, con un intervalo de confianza de 95%. Además, se determinó el contenido de betalaínas totales por medio de espectrofotometría y betalaínas específicas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para determinar si existía una degradación de las mismas. Por otro lado, con una probabilidad ($P > 0,05$) no se observaron diferencias significativas en el contenido de betalaínas totales y específicas a lo largo del tiempo para ambos probióticos.

Posteriormente, se eligió el probiótico que sobrevivió por más días, *L. rhamnosus* LGG®, y se repitió el procedimiento anterior, esta vez con una muestra control de jugo con probiótico y otra muestra con la adición de 6,25 mg/mL de inulina como prebiótico para determinar si proporcionaba un efecto positivo en la población del probiótico a lo largo del tiempo. Se determinó el contenido de betalaínas totales y específicas y se realizaron mediciones de pH,

sólidos solubles y color en los días 0, 7, 14 y 23 con una temperatura de almacenamiento de la bebida de 5 °C.

Al adicionar inulina al jugo de pitahaya inoculado con *L. rhamnosus* LGG® no se experimentó un aumento o disminución significativa en la población de *L. rhamnosus* LGG® durante su almacenamiento, lo anterior con una probabilidad de ($P > 0,05$). Así mismo, no se identificaron diferencias significativas en cuanto a sus características fisicoquímicas de pH, sólidos solubles, color y contenido de betalaínas totales y específicas con respecto a la muestra control ($P > 0,05$).

Dado los resultados anteriores, se demuestra que *L. rhamnosus* LGG® puede sobrevivir a las condiciones de un jugo de pitahaya sin alterar sus propiedades fisicoquímicas como pH, sólidos solubles, color, así como, sin disminuir el contenido de betalaínas totales. Por lo que se considera un microorganismo óptimo para el potencial desarrollo de una bebida de pitahaya probiótica.

PITAHAYA, PROBIÓTICOS, BEBIDA FUNCIONAL, BETALAÍNAS, INULINA

1. Justificación

La pitahaya es un cactus perteneciente al género *Hylocereus* y a la familia Cactaceae. (Ramírez, 2009). En Costa Rica se encuentran especies como *H. costaricensis*, *H. stenopterus* y *H. monocanthus*, entre otras. Su cultivo se realiza principalmente en zonas con un clima seco como en Guanacaste, Puntarenas y algunas zonas de Alajuela como Atenas (Garbanzo-León *et al.*, 2019). En el 2018, el país contaba con 71 productores de pitahaya en las regiones Chorotega, Pacífico Central, Central y del Caribe (Municipalidad de Abangares, 2019). A pesar de que el fruto de la pitahaya no se encuentra dentro de las principales exportaciones de productos frescos, existe una iniciativa de expansión nacional e internacional para productos que poseen potencial de comercialización, entre ellos, la pitahaya (Ulloa, 2017). Costa Rica ha implementado acciones de mejora a nivel agroalimentario para abrirse campo en el mercado internacional; en donde, la pitahaya, se posiciona fuertemente en lugares como Europa y Estados Unidos (Otárola, 2020). La popularidad de esta fruta recae en las propiedades funcionales que se le atribuyen, al presentar compuestos bioactivos antioxidantes como las betalaínas (Verona-Ruiz *et al.*, 2020).

Un alimento con propiedades funcionales es aquel que presenta en su composición y/o formulación compuestos bioactivos con el fin de brindar o potenciar beneficios para la salud humana (Pravst, 2012). En un mercado donde el consumidor se preocupa cada vez más por tener una mejor calidad de vida, los alimentos funcionales se han posicionado e innovado en el transcurso del tiempo (Vodnar *et al.*, 2019a). Dentro de las matrices más utilizadas para la creación de alimentos funcionales se encuentran las bebidas, ya que representan un excelente medio para la incorporación de compuestos bioactivos (Perricone *et al.*, 2015).

En el grupo de bebidas funcionales se encuentran las bebidas lácteas a las que se les adiciona probióticos como elemento funcional (Vicentini *et al.*, 2016). Los probióticos se consideran elementos funcionales ya que su presencia disminuye la posibilidad de presentar problemas gastrointestinales como estreñimiento, el síndrome del intestino inflamado, entre otros (Olivares *et al.*, 2019). Además, tienen la capacidad de actuar como barrera ante microorganismos patógenos que se puedan presentar en el tracto gastrointestinal (Sánchez *et al.*, 2011). Cabe destacar que, para poder obtener los beneficios proporcionados por los probióticos en yogurt la población de bacterias ácido lácticas (BAL) debe ser de mínimo 10^6 UFC/mL (RTCR, 2008) y en alimentos con probióticos de 10^9 UFC/mL (CODEX, 2018).

Debido a lo anterior, resulta de importancia evaluar la población de los microorganismos en la matriz durante el almacenamiento de los alimentos con probióticos.

Los principales microorganismos utilizados como probióticos son del género *Lactobacillus*, *Streptococcus* y bifidobacterias. Estos microorganismos presentan diversos beneficios para la salud, por ejemplo, se le atribuye un efecto preventivo ante enfermedades antiinflamatorias y gastrointestinales (Vizcaíno *et al.*, 2016). El éxito de la incorporación de estos microorganismos en bebidas de frutas depende de factores como la especie y cepa de la bacteria utilizada, el pH del producto final y las condiciones de almacenamiento (Rondon, 2015). En cuanto al pH, el género *Lactobacillus* tiene un rango de resistencia que va desde valores entre 3,7 a 4,3; mientras que, las bifidobacterias ya presentan problemas ante el ácido con valores de pH de 4,6 o inferiores (Wen Fang, 2016). Por otro lado, se han encontrado especies de *Streptococcus* utilizadas como probióticos como *Streptococcus thermophilus* que no sobreviven a pH inferior a 4,5 (Hernandez-Garcia, 2019).

Como se mencionó anteriormente, el uso de probióticos se ha relacionado con productos lácteos; sin embargo, en los últimos años ha incrementado la población que sigue una dieta vegana o que no pueden consumir productos lácteos por intolerancia o alergias a compuestos de la leche (Vodnar *et al.*, 2019a). Dado lo anterior, ha aumentado el interés en innovar con el desarrollo de productos no lácteos que posean probióticos, donde los jugos de frutas se consideran una matriz favorable debido a que no contienen otro cultivo iniciador que represente una competencia de recursos para los microorganismos probióticos (Olivares *et al.*, 2019). Además, la presencia de nutrientes como azúcares, vitaminas y minerales característicos de los jugos de frutas, generan una ventaja en la sobrevivencia de los microorganismos (Wen Fang, 2016). Sin embargo, uno de los retos principales recae en la estabilidad de los microorganismos a valores de pH bajos característicos de los jugos (Perricone *et al.*, 2015).

La estabilización de una bebida de baja acidez en refrigeración puede ser compleja dado los microorganismos patógenos de referencia vinculados que se deben considerar al diseñar el tratamiento térmico de la matriz; específicamente *Clostridium botulinum* (FDA, 2007). Es por esta razón, que explorar la posibilidad de que microorganismos probióticos comerciales puedan desarrollarse en el jugo de pitahaya con un pH por debajo de 4,6 es de particular interés; considerando las ventajas que esta característica fisicoquímica otorgaría al diseñar las condiciones de un tratamiento térmico más moderado para estabilizar microbiológicamente la bebida.

El color característico que presenta la pitahaya es otorgado por pigmentos denominados betalaínas (Padilla, 2012; Rojas De Miguel, 2012). Las betalaínas se derivan del ácido betalámico sintetizado a partir de tirosina, con la característica de ser solubles en agua. A nivel funcional se relaciona el efecto de las betalaínas con la inhibición de oxidación y peroxidación lipídica, prevención de enfermedades cardiovasculares, disminución de enfermedades metabólicas, efectos antiinflamatorios y principalmente propiedades antioxidantes (Song et al., 2015).

Las betalaínas se ven afectadas por factores como pH, temperatura, actividad de agua, luz y concentración de oxígeno (Vergara Hinojosa, 2013). En el caso del pH, las betalaínas son unos de los colorantes naturales más estables, ya que el color se mantiene estable en un pH entre 3-7. Por otro lado, el calor provoca una degradación del pigmento rojo, por lo cual, para mejorar su estabilidad, se recomienda el almacenamiento a bajas temperaturas (Padilla, 2012). La importancia de la estabilidad de las betalaínas no solo recae en las propiedades funcionales, ya que a nivel visual el color juega un rol importante en la decisión del consumidor al comprar un producto. Las nuevas tendencias indican la preferencia de colorantes naturales sobre los sintéticos (Verona-Ruiz *et al.*, 2020).

Dentro de las betalaínas presentes en la pitahaya se encuentran en su mayoría las betacianinas que se reflejan en las tonalidades rojo-violeta, mientras que, las betaxantinas se reflejan en las tonalidades amarillo-naranja; sin embargo, estas últimas se encuentran en menores cantidades (Esquivel & Araya, 2012). La cantidad presente de betalaínas depende de los genotipos, por ejemplo, para la pitahaya roja *Hylocereus* spp. en Costa Rica se ha encontrado genotipos con un contenido de 474 mg/mL hasta rangos que rondan los 700 mg/mL (Esquivel & Araya, 2012). Por otro lado, para *Hylocereus* spp., las principales betalaínas presentes son betanina, filocactina, hilocerenina y sus respectivos isómeros (Stintzing *et al.*, 2002).

Además, la pitahaya presenta oligosacáridos como fuente de carbohidratos, los cuales funcionan como prebióticos naturales. Lo anterior es un punto clave, ya que los probióticos adicionados pueden alimentarse de estos prebióticos generando un crecimiento y aumento de la actividad de las BAL (Verona-Ruiz *et al.*, 2020).

La importancia de realizar este estudio en una matriz como la pitahaya recae principalmente en las características mencionadas anteriormente, el contenido de oligosacáridos que funcionan como prebióticos naturales y su contenido de compuestos bioactivos como las

betalaínas. Lo anterior le brinda la posibilidad de actuar como matriz de un alimento funcional; sin embargo, para conocer su potencial como bebida probiótica no láctea se debe evaluar la sobrevivencia de cepas comerciales de probióticos con propiedades funcionales científicamente confirmadas. Así mismo, es de interés evaluar si la adición de cepas comerciales probióticas puede comprometer negativamente la estabilidad de las betalaínas. Cabe destacar que en este estudio solo se evaluaron los parámetros antes mencionados; se recomienda que, a partir de esto, se pueden desarrollar más investigaciones para determinar si la pitahaya es una matriz idónea para la elaboración de una bebida de probióticos no láctea de interés comercial.

2. Marco teórico

2.1 Probióticos

2.1.1 Definición

La Organización Mundial de la Salud define a los probióticos como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedero” (FAO/WHO, 2006).

2.1.2 Criterios de selección

Los grupos de microorganismos más utilizados como probióticos son las bacterias ácido lácticas, específicamente *Lactobacillus* spp y bifidobacterias como *Bifidobacterium* spp. Las anteriores se consideran como “Generally Recognized As Safe” (GRAS) (Min *et al.*, 2019; Montero-Zamora *et al.*, 2020).

Dentro de los criterios a tomar en cuenta para la selección de probióticos se encuentran: inocuidad, aspectos fisiológicos, funcionales y tecnológicos. Se debe asegurar que el probiótico no vaya a ser dañino para la salud del consumidor por medio de la realización de pruebas *in vitro* e *in vivo*. Además, al ser utilizados en productos alimenticios, se debe realizar una caracterización tecnológica por medio de la cual se definan las condiciones de estabilidad en etapas de procesamiento y almacenamiento (Castillo-Escandón *et al.*, 2019).

Para que puedan tener un efecto positivo en el ser humano, deben ser capaces de, primero, sobrevivir el tracto gastrointestinal, enzimas, jugo gástrico, jugo pancreático y sales biliares, para luego, ser capaz de colonizar y adherirse al epitelio del tracto gastrointestinal (Markowiak & Ślizewska, 2017).

2.1.3 Fuentes de probióticos

Los vehículos para el consumo de probióticos se pueden dividir en dos: suplementos (cápsulas, pastillas o polvos) y alimentos. En el grupo de alimentos, a lo largo de la historia han sobresalido aquellos de origen lácteo, principalmente leches fermentadas y yogurt (Castillo-Escandón *et al.*, 2019). La cantidad de consumo recomendada es de 100 g de alimento con probióticos a una concentración de 10^8 - 10^9 células viables (ISAPP, 2020)

2.1.4 Beneficios para la salud

La microbiota intestinal está relacionada directamente con la relación del hospedero. Diversos factores pueden facilitar un desequilibrio en la microbiota, desde factores ambientales, genéticos, aquellos relacionados al estilo de vida como dieta, consumo de alcohol o tabaco, actividad física, uso de antibióticos o fármacos e inclusive si la persona tuvo un nacimiento natural o por cesárea (James & Wang, 2019).

Dentro de los beneficios que los probióticos brindan al hospedero se encuentra mejorar la microbiota intestinal. Además, ayudan en la prevención de alergias e intolerancia a la lactosa, manejo de la infección por *Helicobacter pylori*, disminución y manejo de la diarrea, proveen un efecto anticancerígeno, ayudan a la prevención en enfermedades inflamatorias intestinales, entre otros (Bernal *et al.*, 2017; Min *et al.*, 2019; Porto *et al.*, 2018). Al consumir probióticos se genera una resistencia al crecimiento de microorganismos como *Salmonella* y *Escherichia coli* que podrían ser perjudiciales en la salud del hospedero (Sangkuanun *et al.*, 2020). Dentro del tracto intestinal, los probióticos son capaces de sintetizar compuestos para el hospedero como vitaminas del grupo B, vitamina K entre otros (Rowland *et al.*, 2018).

Los beneficios para la salud que pueden brindar los probióticos dependen tanto de la cepa como de la especie. Se debe tomar en cuenta la realización de pruebas en la matriz, tomando en cuenta factores como empaque y condiciones de almacenamiento (Castillo-Escandón *et al.*, 2019). Es por esto que si se desea obtener un beneficio en específico es necesario la realización de estudios *in vitro* e *in vivo*, o bien, adquirir probióticos de los cuales sus beneficios estén científicamente comprobados (Bagon *et al.*, 2018; Siow & Wong, 2017).

Uno de los probióticos más estudiados es *Lactobacillus rhamnosus*. Dentro de sus beneficios se encuentra la mejora de la defensa inmunológica contra patógenos en el tracto respiratorio superior, así como prevenir la diarrea asociada al consumo de antibióticos, específicamente los

utilizados para combatir *Helicobacter pylori*. Inclusive se han realizado investigaciones en poblaciones específicas como es el caso de los niños, donde se ha encontrado que es seguro administrarlo y que ayuda a combatir gastroenteritis agudas (Szajewska & Hojsak, 2020).

El probiótico *Lactobacillus paracasei* ha demostrado por su parte un aumento en la respuesta del sistema inmune contra enfermedades como la influenza tipo A (Trachootham *et al.*, 2017). Además, un estudio realizado a varones saludables con edades entre 18 a 60 años y que padecían caspa de moderada a grave identificó que el consumo de este probiótico redujo significativamente la gravedad de los síntomas debido al impacto positivo en el sistema inmunológico de la piel (Reygagne *et al.*, 2017).

2.1.5 Prebióticos

Los prebióticos son componentes alimenticios no digeribles que estimulan el crecimiento de los microorganismos benéficos en el intestino del hospedero, de esta forma, actúan en simbiosis con los probióticos (Aspri *et al.*, 2020). En su mayoría son carbohidratos no digeribles como fibras, oligosacáridos, fructanos y galactanos (James & Wang, 2019; Manihuruk *et al.*, 2017).

El mecanismo de acción de la simbiosis probióticos-prebióticos se basa en que los probióticos sí pueden digerir los prebióticos y los fermentan, como resultado, se producen ácidos grasos de cadena corta los cuales estimulan la respuesta inmune del hospedero contra infecciones virales (Bernal *et al.*, 2017; Sangkuanun *et al.*, 2020). La principal ventaja de los productos conprobióticos que tienen o se le adicionan prebióticos es que estos últimos juegan un papel importante en la viabilidad y sobrevivencia de los probióticos, no solo durante el paso al tracto gastrointestinal, si no también, durante el almacenamiento de los productos (McFarland & Goh, 2019).

2.2 Tendencias de consumo de bebidas no lácteas

Debido a factores como el alto nivel de colesterol de los productos lácteos y a las alergias asociadas a sus proteínas, la industria ha incrementado el desarrollo de productos no lácteos que además presenten algún beneficio adicional a la salud al consumirlo, este es el caso de las bebidas con probióticos a partir de frutas y vegetales (jugos fermentados o sin fermentar e impregnados) (James & Wang, 2019). Para el año 2018, se estimó un aumento del 15% en el consumo de bebidas a base de plantas. Además, se espera que para los próximos 6 años, el mercado de las bebidas no lácteas alcance el 5% del mercado de la leche y productos lácteos (Munekata *et al.*, 2020).

2.2.1 Alimentos funcionales: generalidades y mercado

El concepto de alimentos funcionales hace referencia a aquellos productos alimenticios complementados con ingredientes que pueden mejorar la salud y el bienestar humano tales como proteínas, fibras, vitaminas o probióticos (Min *et al.*, 2019).

Los consumidores se preocupan cada vez más por los beneficios a la salud de los alimentos que ingieren, es por esto que los productos con probióticos representan hasta un 70% del mercado de alimentos funcionales (Aspri *et al.*, 2020). Lo anterior se debe a que existen estudios científicos que comprueban los beneficios que brindan los probióticos a la microbiota intestinal protegiendo al huésped de infecciones gastrointestinales, urinarias, síndrome del colon inflamado entre otros (Olivares *et al.*, 2019).

Para que los probióticos puedan ser funcionales en alimentos como bebidas y aportar los beneficios antes mencionados deben llegar al final de la vida útil del producto que los contiene en una concentración mínima de 10^9 UFC/mL (CODEX, 2018). Lo anterior conlleva cuidados importantes en las etapas de procesamiento, almacenamiento, transporte y vida útil, ya que estas etapas pueden afectar tanto la viabilidad como la sobrevivencia de probióticos (Aspri *et al.*, 2020). La temperatura de almacenamiento en refrigeración (5 °C o menos) del producto final determina un factor importante en la viabilidad de los probióticos y en la calidad física y sensorial del producto (Bernal *et al.*, 2017; Patel, 2017).

2.2.3 Probióticos en productos lácteos vs productos no lácteos

Los jugos de frutas tienen una aceptación grande en el mercado, desde niños hasta adultos, es por esto que representan una opción valiosa en la adición de probióticos (Kandyliis *et al.*, 2016). Además, no solo aumentaría el consumo de frutas y vegetales en la población lo cual tiene un impacto nutricional significativo, sino que también su utilización ayudaría a disminuir el desperdicio postcosecha de frutas y vegetales (Bernal *et al.*, 2017). Otra de las ventajas es que los mismos componentes de una matriz como frutas y vegetales pueden ayudar a la estabilidad de los probióticos, este es el caso de los compuestos fenólicos actuando como un prebiótico (de Oliveira Ribeiro *et al.*, 2020). Actualmente las principales formas de adicionar probióticos en jugo de frutas son sin fermentar el jugo adicionando el probiótico directamente o fermentando el jugo con probióticos (Castillo-Escandón *et al.*, 2019).

Los productos lácteos han sido los principales alimentos a los cuales se le han adicionado probióticos, debido a que su composición brinda un medio óptimo para la viabilidad de los probióticos, como es el caso de la lactoalbúmina y la lactoglobulina que generan un efecto protector ante medios ácidos como los experimentados en los jugos gástricos (Montero-Zamora *et al.*, 2020; Vargas *et al.*, 2015). Sin embargo, la población ha experimentado un aumento en las personas intolerantes a la lactosa, alérgicas a las proteínas de la leche y aquellas que prefieren dietas veganas. Dado a lo anterior, la industria de alimentos ha tenido la tarea de innovar y ampliar las matrices a las cuales incorporar los probióticos (Dias *et al.*, 2018; Vodnar *et al.*, 2019b).

2.2.4 Limitaciones de probióticos en matrices no lácteas

Las bacterias probióticas son susceptibles a factores como pH, concentración de oxígeno, de ácido acético y ácido láctico entre otros. El principal reto que se encuentra al adicionar probióticos en bebidas de frutas es el pH. El rango de pH de la mayoría de los jugos de frutas se encuentra entre 2,5 a 3,7; ejemplo, el jugo de toronja presenta un pH de 3,2; el jugo de naranja de 3,6-3,9; jugo de manzana 3,3 y el jugo de uva de 2,8 (Avalo *et al.*, 2009; Olivares *et al.*, 2019; Patel, 2017).

Debido a esto se debe analizar la cepa y especie de bacteria a utilizar de acuerdo con la matriz elegida. Para productos de origen hortofrutícola se suelen utilizar cepas de *Lactobacillus* las cuales contemplan especies como *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y *L. rhamnosus* así como cepas de *Bifidobacterium lactis* (Bernal *et al.*, 2017). De acuerdo con la literatura, la resistencia al pH para el género *Lactobacillus* abarca valores entre 3,7 a 4,3; mientras que, la resistencia de las bifidobacterias se encuentra en pH por encima de 4,6 (Porto *et al.*, 2018; Tripathi & Giri, 2014).

Otros factores a tomar en cuenta en las matrices para la adición de probióticos es la presencia de posibles componentes inhibitorios que afecten la viabilidad de los probióticos, o, por el contrario, los mismos componentes de una matriz de jugos de frutas y vegetales pueden ayudar a la estabilidad de los probióticos, este es el caso de los compuestos fenólicos actuando como un prebiótico (de Oliveira Ribeiro *et al.*, 2020; Shori, 2016). Frutas como la pitahaya presentan en su matriz oligosacáridos que podrían fortalecer el crecimiento de bacterias como *Lactobacillus* y *Bifidobacterias* (Min *et al.*, 2019).

Las bebidas de frutas y vegetales con probióticos son un gran atractivo para aquellas personas que desean consumir un alimento funcional que además sea fuente de vitaminas, minerales, fibra dietética, antioxidantes y libre de alérgenos lácteos (Dias *et al.*, 2018; Tayo & Akpeji, 2016).

2.3 Pitahaya

2.3.1 Características generales

La pitahaya (*Hylocereus* spp.) es originaria de América Latina e India occidental (Al-Mekhlafi *et al.*, 2021) y pertenece la familia Cactaceae, la cual contiene los géneros "*Hylocereus*" y "*Selenicereus*", siendo el primero el más común contando con 16 especies. El fruto es conocido como Fruta del Dragón y su producción se da principalmente en zonas tropicales o subtropicales (Verona-Ruiz *et al.*, 2020). Su época de floración abarca los meses de junio a setiembre (Garbanzo-León *et al.*, 2019). Las condiciones óptimas para su desarrollo son una altitud entre 800-1850 msnm, temperaturas entre 18-25 °C y suelos con pH entre 5,5-6,5 (Huachi *et al.*, 2015).

Las especies de pitahaya se diferencian por la coloración de su cáscara y pulpa, siendo una variación con cáscara roja (*H. polyrhizus*) y pulpa púrpura mientras que otra presenta cáscara amarilla y pulpa blanca. El peso aproximado de cada fruto varía entre los 200-350 g y dentro de su composición se encuentra principalmente agua seguido por carbohidratos tal y como se presenta en el cuadro I (Huachi *et al.*, 2015).

Cuadro I. Composición nutricional de 100 g de porción comestible de pitahaya *Hylocereus* spp.

Componente	Cantidad (g) ^a	Componente	Cantidad (mg) ^a
Agua	87	Hierro	1,90
Proteína	1,1	Vitamina B1	0,04
Grasa	0,4	Vitamina B2	0,05
Fibra	3,0	Vitamina B3	0,16
Carbohidratos	11,0	Vitamina C	20,50
		Calcio	8,50
		Fósforo	22,50

^a(Farid Hossain *et al.*, 2021)

2.3.2 Producción y comercialización de pitahaya en Costa Rica

La comercialización se realiza desde la fruta entera en las ferias del agricultor, pulpa congelada y como materia prima para diversos productos como refrescos, cervezas, mermeladas, salsas entre otros (PATICA, 2021).

Tradicionalmente la pitahaya ha sido poco aprovechada en Costa Rica; sin embargo, su auge ha aumentado debido a los compuestos funcionales que posee como lo son las betalaínas (Garbanzo-León *et al.*, 2019). Debido a las características morfológicas y nutricionales se considera rentable para la exportación (Huachi *et al.*, 2015) a países como Estados Unidos y Europa (PROCOMER, 2021).

2.3.3 Pitahaya como alimento funcional

La pitahaya es consumida por su alto contenido nutricional al aportar macronutrientes como carbohidratos, proteínas, grasas y fibra, micronutrientes como vitamina C, calcio, potasio, magnesio y compuestos bioactivos como ácidos fenólicos, flavonoides y fitoalbúmina (Mahayothee *et al.*, 2019; Nerdy & Manurung, 2018).

Asimismo, se considerada un alimento funcional ya que su consumo se ha relacionado con varios beneficios para la salud tales como un efecto antidiabético al ayudar a regenerar las células beta pancreáticas (Poolsup *et al.*, 2019). Estudios han evaluado el efecto del consumo de jugo de pitahaya roja en mujeres embarazadas con anemia obteniendo resultados positivos en niveles de hemoglobina y eritrocitos durante los primeros 7 días de tratamiento (Widyaningsih *et al.*, 2017).

Por otro lado, los oligosacáridos encontrados en la pitahaya varían dependiendo de la especie, pueden corresponder entre el 8,60-50,01% de los carbohidratos. Estos oligosacáridos poseen efecto prebiótico el cual es considerado como componente funcional en alimentos al mejorar el sistema inmunológico (Pansai *et al.*, 2020). Estudios en ratas han confirmado que el efecto prebiótico promueve el crecimiento de bacterias beneficiosas en el tracto gastrointestinal como lo son *Lactobacillus* y bifidobacterias y reducir aquellas perjudiciales como *Enterococcus* en el colon (Sangkuanun *et al.*, 2020)

También, se destaca su valor antioxidante, anticancerígeno y hepatoprotector (Nerdy & Manurung, 2018). El poder antioxidante en la pitahaya es de 160,84 mg de Trolox/100mL de jugo y se le atribuye a compuestos como betalaínas, fenolatos y ácido gálico; sin embargo, las más

eficientes son las betalaínas (Hakim *et al.*, 2018; Verona-Ruiz *et al.*, 2020). El contenido de compuestos fenólicos y flavonoides (antioxidantes) es mayor en la pitahaya de pulpa púrpura que la de pulpa blanca (Arivalagan *et al.*, 2021).

2.4 Betalaínas

2.4.1 Betalaínas:

Los pigmentos son los responsables de atribuir el color característico de plantas, frutas, vegetales y cereales. Entre ellos están la clorofila, carotenoides, flavonoides, antocianinas y betalaínas, siendo estas dos últimas mutuamente excluyentes ya que nunca se encuentran juntas (Miguel, 2018). Las betalaínas son pigmentos de raíces encontrados en la remolacha, amaranto, espinaca malabar y pitahaya (Flores-Mancha *et al.*, 2019). Son solubles en agua, son el resultado de la síntesis de la tirosina y su estructura central es el ácido betalámico [ácido 4-(2-oxoetilideno)-1,2,3,4 tetrahidropiridin-2,6-dicarboxílico]. Se dividen en betacianinas y betaxantinas su estructura se representa en la figura 1 (Mahayothee *et al.*, 2019; Rodriguez *et al.*, 2016).

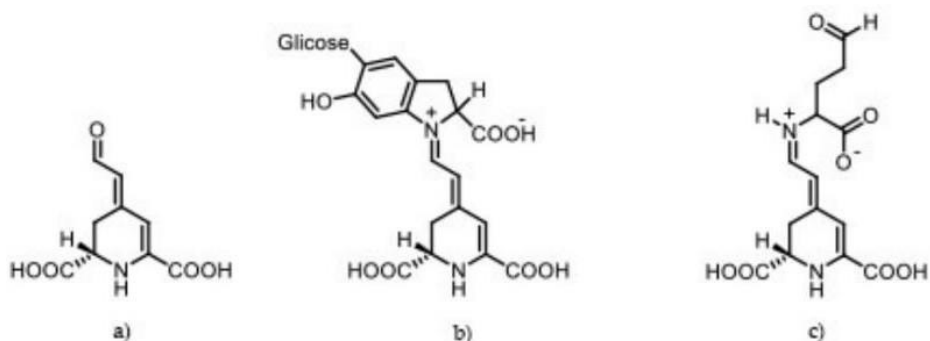


Figura 1. Estructura del ácido betalámico (a), betaxantinas (b) y betacianinas (c) (Flores-Mancha *et al.*, 2019).

Las betalaínas son principalmente usadas en la industria como pigmentos naturales debido al aumento en las preferencias del consumidor por el uso de aditivos naturales a los sintéticos. En la industria de alimentos se conoce como el colorante E162 y es usado en productos como gelatinas, bebidas no alcohólicas, productos lácteos, confites entre otros (Bassama *et al.*, 2021).

La principal desventaja de las betalaínas es su inestabilidad y por ende su degradación (Liu *et al.*, 2019). Diversos factores afectan su estabilidad, el oxígeno, actividad de agua, calor, luz, oxidación, iones metálicos, nitrógeno atmosférico, fermentación, enzimas entre otros (Liu *et al.*, 2019). Se han encontrado mejores resultados cuando es utilizada en productos con valores de pH

entre 4,0 y 6,0 y cuando estos productos presentan una vida útil corta y son almacenados a temperaturas de 5 °C o menores (Khan, 2016).

2.4.2 Betacianinas

Las betacianinas se forman al darse la condensación del ácido betalámico con ciclo-dihidroxifenilalanina o derivados glucosídicos con pigmentación violeta (Liu *et al.*, 2019). Existen 51 estructuras de betacianinas y se divide en grupos estructurales los cuales son: betanina, amaranto y buganvilla (Choo, 2019; Slimen *et al.*, 2017). Se encuentran más presentes que las betaxantinas (Choo, 2019). En el caso de la pitahaya, la estructura principal es la betanina. Pese a que el rango de estabilidad de pH es amplio al ser de 3,0 a 7,0 su estabilidad se ve mejorada en pH ácido aproximadamente en valores de pH de 4,0 y 5,0 (Antigo *et al.*, 2018; Flores-Mancha *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019).

2.4.3 Betaxantinas

Las betaxantinas se forman al condensar con aminoácidos o derivados, formando pigmentos amarillos (Liu *et al.*, 2019). Existen 23 estructuras y se dividen en grupos conjugado derivado de aminoácidos y grupos conjugados derivados de aminas (Choo, 2019).

2.4.4 Beneficios para la salud de las betalaínas

Dentro de los principales beneficios se encuentran las características antioxidantes, antidiabéticas, antiinflamatorias y anticancerígenas (Flores-Mancha *et al.*, 2019). La bioviabilidad antioxidante se considera igual de potente que la de los flavonoides (Choo, 2019). Un factor importante que alberga la biodisponibilidad de las betalaínas es que estas han sido comprobadas al encontrarse presente en la orina humana luego de su consumo (Kaur *et al.*, 2018).

En un estudio realizado con ratones se comprobó el efecto positivo de las betalaínas presentes en la pitahaya. Los ratones presentaron una mejora en el perfil lipídico, así como un efecto antidiabético (Verona-Ruiz *et al.*, 2020). También se ha encontrado un beneficio en la disminución del riesgo cardiovascular al reducir el daño oxidativo y la hemólisis de los glóbulos rojos (Kaur *et al.*, 2018). Aunado a lo anterior, la disminución del riesgo cardiovascular está asociado al peso corporal, glucosa en sangre, triglicéridos y colesterol (Cheok *et al.*, 2020). Se han realizado experimentos que demuestran la inhibición significativa de un 40-60% del ciclo de crecimiento de células cancerosas en zonas como en cuello uterino y el epitelio cervical (Castro-Enríquez *et al.*, 2019).

2.4.5 Métodos de identificación

Por medio de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) es posible cuantificar las betalaínas específicas en una muestra que las contenga. Su funcionamiento se basa en la capacidad de separación y análisis de los componentes de la muestra de acuerdo a su afinidad por polaridad con la fase estacionaria del equipo (Suarez Ospina & Morales Hernández, 2018).

Se puede cuantificar la cantidad de betacianinas y betaxantinas totales presentes en una muestra por medios espectrofotométricos. En el caso de las betacianinas su valor máximo de absorción es de 540 nm, mientras que, la estructura del compuesto amino en las betaxantinas es la encargada de dictar la absorción máxima de las betaxantinas la cual se encuentra entre 460 a 480nm (Slimen *et al.*, 2017).

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluar la sobrevivencia de dos microorganismos probióticos, el efecto de la adición de inulina y la estabilidad de las betalaínas en jugo de pitahaya para valorar el uso potencial de esta materia prima en la elaboración de una bebida probiótica.

3.2 Objetivos específicos

- 3.2.1 Evaluar la sobrevivencia de dos microorganismos probióticos seleccionados en un jugo de pitahaya a través del tiempo de almacenamiento.
- 3.2.2 Evaluar el efecto de la adición de inulina en la sobrevivencia del microorganismo probiótico de mejor adaptación en jugo de pitahaya a través del tiempo.
- 3.2.3 Cuantificar el contenido de betalaínas en un jugo de pitahaya inoculado con probióticos comerciales durante su almacenamiento en refrigeración para determinar la estabilidad de estos compuestos bioactivos.

4. Materiales y métodos

4.1 Localización del trabajo

El proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de química la Escuela de Tecnología de Alimentos y el de microbiología del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos

(CITA), ambos en las instalaciones de la Universidad de Costa Rica, sede Rodrigo Facio, San Pedro, Montes de Oca.

4.2 Elaboración del jugo de pitahaya

Se utilizó pulpa de pitahaya congelada, la cual fue cultivada y procesada en un estado de madurez completa en Bagaces, Guanacaste. La pulpa se descongeló y se filtró con una manta para retirar el mucílago y obtener solo el jugo líquido para los posteriores análisis. No se le adicionó ningún otro ingrediente a la bebida.

Para garantizar la ausencia de microbiota competitiva que pueda comprometer el comportamiento de los probióticos a inocular durante el almacenamiento de la bebida, se realizó una esterilización de la bebida a 93,3 °C por 0,1 minutos realizando de forma inmediata un llenado en caliente a esa misma temperatura, tapando e invirtiendo las botellas por al menos 3 minutos. Se utilizaron botellas de vidrio transparente con tapa de rosca y las mismas fueron llenadas con 200 mL de bebida dejando un espacio de cuello de botella de aproximadamente 5 mL. Luego de la esterilización el jugo fue almacenado a 5 °C hasta su inoculación y posteriormente a esta misma temperatura durante el tiempo del análisis (Pflug, 2003).

4.3 Preparación de probióticos e inoculación

Se utilizaron dos cepas de probióticos disponibles comercialmente; cuyos beneficios a la salud humana ya se encuentran debidamente estudiados y confirmados, la primera cepa corresponde a *Lactobacillus rhamnosus* (LGG®) y la segunda a *Lactobacillus paracasei* (*L. casei* 431®). Ambas se inocularon de acuerdo con la recomendación del proveedor. La concentración inicial en el jugo de pitahaya para el caso del estudio de sobrevivencia fue de una población de alrededor de 11 UFC/mL.

Para la preparación de las muestras se inocularon 200 mL de jugo comercialmente estéril con cada probiótico; en condiciones asépticas, se pipetearon muestras independientes de 15 mL de jugo de pitahaya previamente esterilizado e inoculado, y se vertieron en tubos de ensayo estériles; considerando un tubo para cada punto de muestreo, de tal forma que la reducción del volumen por toma de muestra no representara una posible fuente de error en el experimento y que no existiera la posibilidad de contaminación de todas las muestras durante la toma de muestra.

4.4 Métodos de análisis

4.4.1 Recuento de microorganismos probióticos

Para el recuento de BAL y de acuerdo a Wen Fang (2016); se tomó 1 mL de cada jugo y se adicionó

(CITA), ambos en las instalaciones de la Universidad de Costa Rica, sede Rodrigo Facio, San Pedro, Montes de Oca.

4.2 Elaboración del jugo de pitahaya

Se utilizó pulpa de pitahaya congelada, la cual fue cultivada y procesada en un estado de madurez completa en Bagaces, Guanacaste. La pulpa se descongeló y se filtró con una manta para retirar el mucílago y obtener solo el jugo líquido para los posteriores análisis. No se le adicionó ningún otro ingrediente a la bebida.

Para garantizar la ausencia de microbiota competitiva que pueda comprometer el comportamiento de los probióticos a inocular durante el almacenamiento de la bebida, se realizó una esterilización de la bebida a 93,3 °C por 0,1 minutos realizando de forma inmediata un llenado en caliente a esa misma temperatura, tapando e invirtiendo las botellas por al menos 3 minutos. Se utilizaron botellas de vidrio transparente con tapa de rosca y las mismas fueron llenadas con 200 mL de bebida dejando un espacio de cuello de botella de aproximadamente 5 mL. Luego de la esterilización el jugo fue almacenado a 5 °C hasta su inoculación y posteriormente a esta misma temperatura durante el tiempo del análisis (Pflug, 2003).

4.3 Preparación de probióticos e inoculación

Se utilizaron dos cepas de probióticos disponibles comercialmente; cuyos beneficios a la salud humana ya se encuentran debidamente estudiados y confirmados, la primera cepa corresponde a *Lactobacillus rhamnosus* (LGG®) y la segunda a *Lactobacillus paracasei* (*L. casei* 431®). Ambas se inocularon de acuerdo con la recomendación del proveedor. La concentración inicial en el jugo de pitahaya para el caso del estudio de sobrevivencia fue de una población de alrededor de 11 UFC/mL.

Para la preparación de las muestras se inocularon 200 mL de jugo comercialmente estéril con cada probiótico; en condiciones asépticas, se pipetearon muestras independientes de 15 mL de jugo de pitahaya previamente esterilizado e inoculado, y se vertieron en tubos de ensayo estériles; considerando un tubo para cada punto de muestreo, de tal forma que la reducción del volumen por toma de muestra no representara una posible fuente de error en el experimento y que no existiera la posibilidad de contaminación de todas las muestras durante la toma de muestra.

4.4 Métodos de análisis

4.4.1 Recuento de microorganismos probióticos

Para el recuento de BAL y de acuerdo a Wen Fang (2016); se tomó 1 mL de cada jugo y se adicionó

a 9 mL de agua peptonada estéril al 1 %, realizando diluciones seriadas hasta 10^{-10} . Se pipetearon 1 mL de la dilución en tubo de ensayo para inocular por duplicado en placas 3M™ Petrifilm. La incubación de las placas se realizó a 37 ± 1 °C por 48 ± 3 h (Wen Fang, 2016).

4.4.2 Determinación de la concentración de betalaínas

4.4.2.1 Identificación y cuantificación de betalaínas específicas mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

La cuantificación de la concentración de betalaínas en pitahaya se realizó por HPLC, de acuerdo con lo establecido por Esquivel *et al.* 2007 luego de tomar muestras directas del jugo, las muestras fueron filtradas con un filtro de 0,2 μm . El equipo de marca Ultimate 3000 cuenta con una columna analítica de fase reversa (C18, 4,6 X 150 mm, tamaño de partícula de 5 μm , Acclaim 120, Thermo Scientific, USA). Para la fase móvil A se utilizó ácido fórmico en agua al 0,2 % (v/v) mientras que para la fase móvil B MeCN:H₂O (80:20, v/v). La determinación se llevó a cabo a 536 nm donde se calcularon las áreas relativas del cromatograma y los rangos específicos para las betacianinas más relevantes. El volumen de inyección fue de 0,5 mL, con un flujo de eluentes de 1 mL/min. Se programó con una temperatura de horno de 30°C, la gradiente de elución fue isocrática 100% de A durante los primeros 5 minutos, seguido de 10% de B a los 20 minutos, 13% de B a los 40 minutos, 20% de B a los 45 minutos y 100% de B a los 50 minutos.

4.4.2.2 Cuantificación de betalaínas totales mediante espectrofotometría

La cuantificación de la concentración de betalaínas totales por espectrofotometría se realizaron de acuerdo a lo mencionado por Schweiggert *et al.* 2009 luego de tomar muestras directas del jugo. Se utilizó un espectrofotómetro Jasco V-630 (Schweiggert *et al.* 2009). Se utilizó un valor de absorción de $\lambda_{\text{max}} = 536$ nm corregido a 600 nm y un coeficiente de extinción molar de $\epsilon = 60,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.4.3 Determinación del pH

Se tomó una muestra de la bebida a temperatura ambiente y sin la adición de agua se realizó la medición siguiendo el procedimiento del CITA (2016a) “P-SA-MQ-012” basado en el método número 981.12 de la AOAC (2005).

4.4.4 Determinación de color

Se determinó el color en cada punto de muestreo (día 0, 7, 14 y 23) del jugo de pitahaya con inulina y el jugo control colocando 10 mL en el HunterLab Color Flex 450 con una iluminación primaria D65/10, secundaria F02/10 y terciaria C/10, con un modo de reflectancia y un área de

medición de 1,250 pulgadas (Hunterlab, 2018).

4.4.5 Determinación de sólidos solubles

Se determinó la concentración de sólidos solubles expresada como °Brix, en cada punto de muestreo (día 0, 7, 14 y 23) del jugo de pitahaya con inulina y el jugo control. Lo anterior siguiendo el procedimiento del CITA (2015) “P-SA-MQ -046” basado en el método número 932.12 de la AOAC (2012).

4.5 Diseño experimental y análisis estadístico

4.5.1 Objetivo 1: *Evaluación de la sobrevivencia de dos microorganismos probióticos seleccionados en un jugo de pitahaya a través del tiempo de almacenamiento*

4.5.1.1 Diseño experimental

Se realizó un diseño irrestricto aleatorio con un factor de dos niveles que corresponde a cada probiótico y otro factor que corresponde al tiempo de muestreo durante el almacenamiento a 5 °C del jugo inoculado. El tiempo de muestreo para *L. rhamnosus* LGG® fue a los 0, 7, 14 y 23 días y para *L. casei* 431® fue 0, 2, 5, 7 y 9 días. Se trabajó con un único lote de jugo de pitahaya aplicando los tratamientos por triplicado. El tiempo se analizó como un factor continuo.

4.5.1.2 Análisis estadístico

Para determinar si existían diferencias significativas entre las poblaciones iniciales de los dos probióticos utilizados se realizó una prueba t-student por medio del complemento de Excel XLSTAT y con un nivel de significancia del 5 %. De igual forma por medio de una prueba t-student se determinó si existían diferencias significativas entre las poblaciones finales de los dos probióticos. Las concentraciones de cada probiótico obtenidas a través del tiempo se analizaron por medio de un modelo logístico de tercer orden para *L. rhamnosus* LGG® y de cuarto orden para *L. casei* 431.

Utilizando una predicción inversa se calculó el tiempo en el que la población alcanzó los 9 logaritmos para cada jugo inoculado. Se realizó una prueba t-student para determinar si existía diferencia significativa en los tiempos determinados en la predicción inversa por medio del complemento de Excel XLSTAT y con un nivel de significancia del 5 %.

4.5.2 Objetivo 2: *Evaluación el efecto de la adición de inulina en la sobrevivencia del microorganismo probiótico que mejor se adaptó en jugo de pitahaya a través del tiempo.*

4.5.2.1 Diseño experimental

Se eligió el probiótico cuya tasa de decrecimiento fue menor y realizó un diseño irrestricto aleatorio de dos factores. El primer factor de dos niveles que corresponde al jugo inoculado con el probiótico y con la adición de 6,25 mg/mL de inulina Orafiti® de cadena corta y al control (jugo inoculado sin adición de inulina); el otro factor corresponde al tiempo de muestreo durante el almacenamiento a 5 °C de ambos jugos inoculados. Los tiempos de muestreo fueron los días 0, 14 y 23. La cantidad de inulina adicionada fue determinada de acuerdo a lo indicado por la casa proveedora, siendo 6,25 mg/mL la cantidad que debe contener una porción del producto para declarar que contribuye a alcanzar el beneficio relacionado (BENEIO, 2019).

Se realizó una evaluación del perfil fisicoquímico del jugo durante el almacenamiento en los días 0, 7, 14 y 23. Se determinó el contenido el pH, contenido de sólidos solubles y el color por medio de la diferencia de color (ΔE^*) usando L^* , a^* y b^* . Para esto se utilizó el equipo HunterLab Color Flex 450. La diferencia de color (ΔE^*) fue determinada por medio de la siguiendo Ecuación (1)

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

- ΔL^* , Δa^* y Δb^* : diferencia de color entre día 0 y 23.

Para determinar la diferencia de color durante los tiempos de muestreo analizados se utilizó la Ecuación (2)

$$\Delta E^* = [(L_0^* - L_t^*)^2 + (a_0^* - a_t^*)^2 + (b_0^* - b_t^*)^2]^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

- Subíndice 0: muestras inoculadas en el día 0
- t: muestras de jugo inoculadas en los días 7, 14 y 23.

Aunado a lo anterior, se determinó el valor hue (h°) y Croma (C) por medio de L^* , a^* y b^* y a través de las Ecuaciones (3) y (4) presentadas a continuación:

$$h^{\circ} = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a} \right) \quad (3)$$

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad (4)$$

4.5.2.2 Análisis estadístico

Se aplicó una regresión lineal simple para determinar si existían diferencias significativas en la tasa de decrecimiento de la población entre la inoculación con inulina y el control. Se rigió bajo la ecuación 5:

$$\log (\text{población}) = a + b * \text{tiempo} \quad (3)$$

a: intercepto

b: pendiente

Por medio de la prueba t-student se comparó las pendientes de ambos jugos inoculados. Lo anterior por medio del complemento de Excel XLSTAT y con un nivel de significancia del 5%. Para determinar si existía diferencias significativas entre el perfil fisicoquímico (pH, sólidos solubles y color) se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con un 5% de significancia por medio del complemento de Excel XLSTAT.

4.5.3 Objetivo 3: Cuantificación del contenido de betalaínas en un jugo de pitahaya inoculado con los probióticos comerciales durante su almacenamiento en refrigeración para determinar la estabilidad de estos compuestos bioactivos.

4.5.3.1 Diseño experimental

Se utilizó un diseño unifactorial, con niveles que corresponden al tiempo de almacenamiento de las bebidas, para el primer objetivo específico, para cada probiótico con su respectivo control (jugo sin inocular) y los muestreos en la ejecución del segundo objetivo (días 0, 14 y 23) para jugo inoculado con inulina y su respectivo control. En cada uno de los puntos de muestreo de ambos experimentos, se cuantificó la concentración de betalaínas totales y específicas.

4.5.3.2 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para determinar si existía diferencias significativas en el contenido de betalaínas totales y de las principales betalaínas presentes durante

los tiempos de almacenamiento para el objetivo 1 y el objetivo 2. Lo anterior con un 5% de significancia por medio del complemento de Excel XLSTAT.

5. Resultados y discusión

Objetivo 1: “*Evaluar la sobrevivencia de dos microorganismos probióticos seleccionados en un jugo de pitahaya a través del tiempo de almacenamiento*”.

De acuerdo con la literatura, el jugo de pitahaya presenta un pH entre 5,00-5,50 y un contenido de sólidos solubles de 13 °Brix (Muhialdin *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2020). Sin embargo, el jugo de pitahaya utilizado en el análisis de la sobrevivencia de *L. rhamnosus* LGG® y *L. casei* 431 presentó un pH natural de $3,78 \pm 0,04$ y un contenido de sólidos solubles de 11 °Brix. Cabe destacar que la caracterización fisicoquímica de pH y sólidos solubles en el jugo de pitahaya va a depender de diversos factores como maduración del fruto, disponibilidad de nutrientes durante el cultivo, localización del cultivo, clima, entre otros (Jalgaonkar *et al.*, 2020).

La importancia de determinar el valor del pH y los sólidos solubles en el jugo de pitahaya a evaluar recae en el posible efecto de estos parámetros sobre la sobrevivencia de los microorganismos probióticos. Como se puede observar en la figura 2, se realizó un estudio de almacenamiento a 5 °C a través del tiempo hasta que los probióticos alcanzaran la concentración mínima de 9 log UFC/mL requerida para obtener beneficios en la salud proveniente de alimentos con probióticos según el CODEX Alimentarius (CODEX, 2018). Para poder realizar un estudio homogéneo se inocularon ambos probióticos a una concentración inicial de 11 UFC/mL en muestras independientes. Al analizar estadísticamente esta concentración inicial con una prueba t-student no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$).

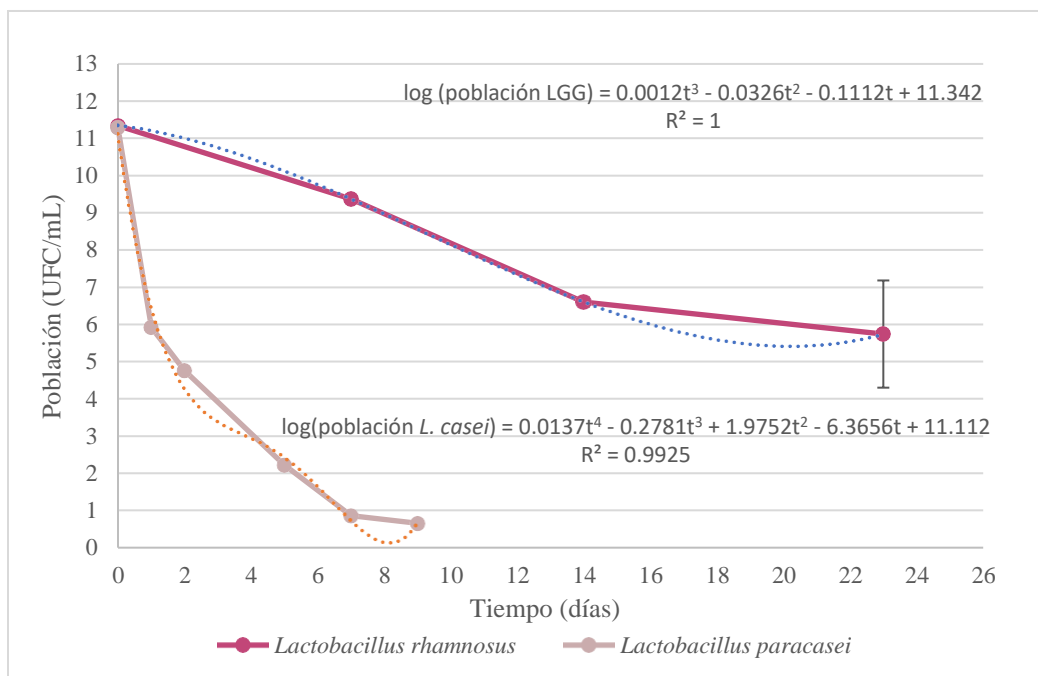


Figura 2. Cinética de sobrevivencia de *L. rhamnosus* LGG® y *L. casei* 431 en jugo de pitahaya almacenado a 5 °C durante el tiempo con un n=3.

L. rhamnosus LGG® alcanzó la concentración de 9 UFC/mL a los 7,95 días; mientras que, *L. casei* 431 a los 0,37 días ya se encontraba en una concentración de 9 log (UFC/mL). Al realizar el análisis estadístico utilizando la prueba t-student se reflejaron diferencias significativas con un ($P < 0,0001$) para la media de los días en los cuales los probióticos se encontraban en el límite indicado en el CODEX (CODEX, 2018). Además, estudios indican que los beneficios relacionados a la salud en el caso de *L. rhamnosus* LGG® se cumplen al estar el probiótico en una concentración superior a los 9 log (UFC/mL) (Segers & Lebeer, 2014). Lo anterior indica que *L. rhamnosus* LGG® presentó una mejor viabilidad al medio que *L. casei* 431.

A nivel comercial *L. casei* ha sido utilizada en bebidas de piña con una sobrevivencia de hasta 42 días en almacenamiento (Lillo-Pérez *et al.*, 2021). Además, estudios demuestran que este probiótico es capaz de sobrevivir hasta 13 días a una temperatura de almacenamiento entre 4 – 7 °C en una bebida fermentada de calabaza con un pH inicial de 6,5 y un contenido de sólidos solubles de 10 °Brix (Dimitrovski *et al.*, 2021). Mientras que, en una bebida fermentada de zanahoria logró mantener una concentración de 8 a 10 log (UFC/mL) por hasta 6 semanas de almacenamiento a 5 ± 1 °C con un pH de 5 y un contenido de sólidos solubles de 12 °Brix (Alwis *et al.*, 2016). En jugo de remolacha fermentado, con un pH inicial de 5,60 *L. casei* 431 se mantuvo

en una concentración de 6 a 8 log (UFC/mL) por cuatro semanas de almacenamiento a 5 °C (Gamage *et al.*, 2016). Lo anterior indica que el valor del pH ligeramente ácido del jugo de pitahaya pudo ser una variable negativa en la sobrevivencia de *L. casei* 431, entre otros factores.

Otra variable que interviene en la sobrevivencia de *L. casei* 431 es la composición de la matriz donde es inoculada. Por ejemplo, en el caso del jugo de zanahoria, la presencia de fructooligosacáridos e inulina como fuente de prebióticos, así como a la adición de sacarosa permiten que *L. casei* 431 metabolice y fermente estos carbohidratos para la obtención de ácido láctico (Alwis *et al.*, 2016). Se ha demostrado que la adición de fructosa, sacarosa y glucosa aumentan el efecto de los prebióticos (Alwis *et al.*, 2016; Verona-Ruiz *et al.*, 2020).

Para mejorar la sobrevivencia de *L. casei* 431 se recomienda combinar las bebidas de frutas con banano, esto por el alto contenido de oligosacáridos, inulina, oligofructosa, vitaminas y minerales. Tal como se demuestra en un estudio donde la sobrevivencia del probiótico se vio significativamente mejorada al utilizar un 7% de puré de banano en jugo de manzana (Mahdavi *et al.*, 2018). Si bien no todas las bebidas de frutas se pueden combinar con puré de banano debido a parámetros sensoriales, la microencapsulación puede ser la solución para mejorar la sobrevivencia de *L. casei* 431 ya que podría brindar una protección en la matriz donde se encuentre (How & Pui, 2021).

La razón de la mejor viabilidad de *L. rhamnosus* LGG® puede estar relacionada a que distintos aislamientos de BAL que se agrupan en el género *Lacticaseibacillus* (Zheng *et al.*, 2020) presentan una resistencia al pH a valores que se encuentran entre 3,70 - 4,30 (Tripathi & Giri, 2014). Así lo demuestran estudios como el realizado al fermentar *L. rhamnosus* LGG® con jugo de naranja fortificado con la planta ortiga, donde con un pH inicial fue de $3,68 \pm 0,10$ *L. rhamnosus* LGG® estuvo por encima de los 6 UFC/mL por un tiempo de 28 días y a una temperatura de almacenamiento muy similar a la del presente estudio, 4 °C (Sengun *et al.*, 2020). Así mismo, pruebas *in vivo* han demostrado la presencia de 7,1 UFC/mL de *L. rhamnosus* LGG® en heces de humanos luego de 28 días de consumir una bebida de piña y palmera de Jaussara inoculada con este probiótico, demostrando no solo la sobrevivencia del mismo en el jugo sino también su capacidad para sobrevivir en el tracto gastrointestinal (de Almeida *et al.*, 2019).

Al igual que en el caso de *L. casei* 431, el pH no es la única variable que afecta la sobrevivencia de *L. rhamnosus* LGG® en el medio. Las frutas utilizadas en la bebida deben tener presente fibra en su composición, ya que, la fibra soluble funciona como sustrato para el probiótico. mientras que la insoluble puede tener un efecto protector durante el paso por el tracto gastrointestinal (Ray & Dasgupta, 2014). Al evaluar la sobrevivencia a través del tiempo y la capacidad de sobrevivir a pH ácido de $3,78 \pm 0,04$ del jugo de pitahaya se seleccionó al probiótico *L. rhamnosus* LGG® para evaluar el efecto de la adicción de fibra soluble, en este caso, inulina, sobre la sobrevivencia de *L. rhamnosus* LGG® durante el almacenamiento a 5 °C en el desarrollo del objetivo 2.

Objetivo 2: “Evaluar el efecto de la adición de inulina en la sobrevivencia del microorganismo probiótico que mejor se adaptó en jugo de pitahaya a través del tiempo.”

La figura 3 presenta el comportamiento de la muestra control de jugo de pitahaya con *L. rhamnosus* LGG® versus la muestra a analizar de jugo de pitahaya inoculada con *L. rhamnosus* LGG® y con la adicción de inulina durante 23 días de almacenamiento A 5 °C. Pese a que la literatura indica que la presencia de inulina tiene un efecto prebiótico sobre *L. rhamnosus* LGG® (Figuroa-González *et al.*, 2005), al realizar una regresión lineal simple no se observó que las pendientes fueran significativamente diferentes, lo anterior con un (P = 0,62). Cabe destacar que la cantidad de inulina adicionada fue de 6,25 mg/mL, siendo esta la cantidad indicada por el proveedor como máxima para obtener beneficios en la salud en una porción de 200 mL.

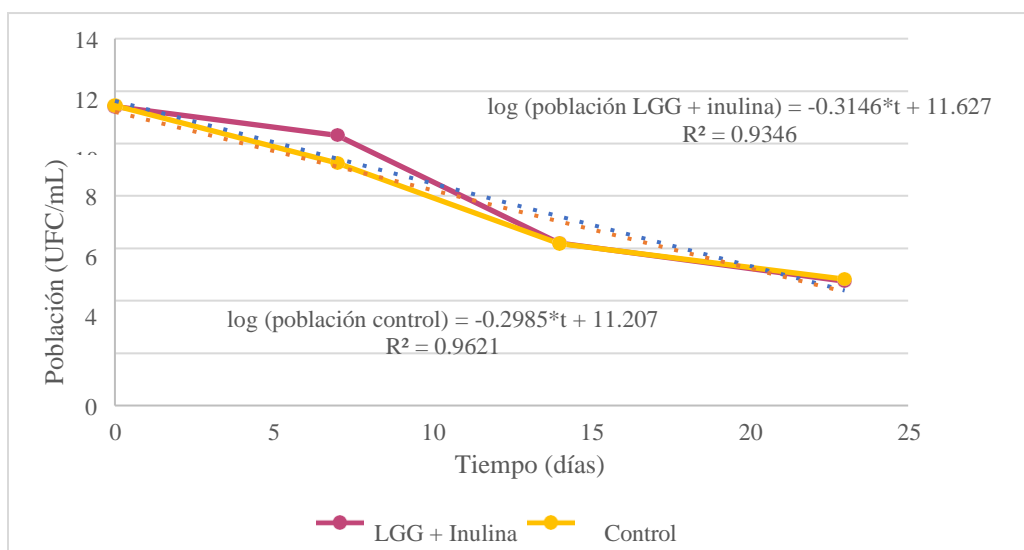


Figura 3. Población de *L. rhamnosus* LGG® en jugo de pitahaya con y sin inulina (control) almacenado a 5 °C durante 23 días con un n=3.

No en todas las ocasiones que se ha adicionado un prebiótico a una bebida frutal probiótica se han tenido buenos resultados. En el 2019, Nguyen *et al.*, se utilizó una inulina de cadena corta al igual que en el presente estudio y al comparar la viabilidad de *L. acidophilus* La5, *L. plantarum* 299V y *B. lactis* Bb12 en un jugo de piña fermentado con la adición de fructooligosacárido como prebiótico no se observó una mejoría en la sobrevivencia durante el almacenamiento (Nguyen *et al.*, 2019). Así mismo, la mejoría en la sobrevivencia del probiótico puede verse afectada por otros ingredientes utilizados, no solo un prebiótico. Un estudio analizó la influencia de inulina y de Stevia sobre la sobrevivencia de *L. rhamnosus* TCC 7469 en jugo de guayaba fermentado y no fermentado, en donde la inulina no tuvo efecto significativo en estos jugos, mientras que la estevia aumentó la supervivencia en condiciones gastrointestinales en una tasa del 80% de jugo fermentado y de 182% en jugo no fermentado (Andrade *et al.*, 2019). Cabe destacar que los oligosacáridos presentes en la pitahaya pueden estar cumpliendo la función prebiótica para *L. rhamnosus* LGG® (Verona-Ruiz *et al.*, 2020) donde la diferencia radica en que los oligosacáridos presentan cadenas medianas de azúcares mientras que los fructanos como la inulina utilizada son de cadena corta (BENEIO, 2019).

Adicionalmente, se analizó el perfil fisicoquímico del jugo control sin inulina y del jugo inoculado con *L. rhamnosus* LGG® y con la adición de inulina. Los resultados obtenidos en la determinación del pH y de sólidos solubles durante los días de almacenamiento se muestran en el cuadro II.

Cuadro II. Características fisicoquímicas de pH y sólidos solubles del jugo de pitahaya con inulina y el control (sin inulina) inoculados con el probiótico *L. rhamnosus* LGG® durante el almacenamiento a 5 °C.

Día de almacenamiento	Características fisicoquímicas			
	pH		Sólidos solubles (°Brix)	
	Jugo + LGG + inulina	Jugo + LGG	Jugo + LGG + inulina	Jugo + LGG
0	3,72±0,08	3,71±0,08	11,7±0,6	11,3±0,5
7	3,73±0,08	3,7±0,1	11,6±0,6	11,3±0,5
14	3,7±0,1	3,7±0,2	11,8±0,7	11,5±0,4
23	3,7±0,1	3,7±0,1	11,7±0,5	11,0±0,0

Resultados indican un promedio y una desviación estándar (\pm) para un n=3.

Al realizar un análisis de varianza se determinó no se identificaron diferencias significativas en el pH y sólidos solubles de la muestra control y la muestra con inulina durante los 23 días de almacenamiento, lo anterior con un nivel de significancia de 5%. Sin embargo, se ha demostrado que la adición de cepas de BAL como lo es *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 en una bebida fermentada de sandía con y sin adición de inulina presenta una disminución del pH y un incremento de los sólidos solubles (Amanda & Choo, 2018). De acuerdo con de Oliveira *et al.*, la disminución del pH es esperada en una bebida fermentada debido a la acción fermentativa de los probióticos en el medio; sin embargo, un pH muy bajo puede afectar la bebida a nivel sensorial (de Oliveira *et al.*, 2021), por lo que los resultados obtenidos pueden ser positivos en futuras investigaciones al realizar la formulación de la bebida de jugo de pitahaya. Por otra parte, los sólidos solubles pueden aumentar al adicionar inulina en comparación a la muestra control y a su vez, tanto en la muestra control como en la que presenta inulina los sólidos solubles pueden disminuir a través del tiempo debido a la utilización de los mismos por parte de las BAL durante sus actividades metabólicas (Tayo & Akpeji, 2016).

El color fue analizado como diferencia de color total (ΔE), la cual hace referencia a la suma de las diferencias en todas las medidas de color (L^* , a^* , b^*). Lo anterior a través del tiempo en la muestra control y en la muestra con adición de inulina tal y como se muestra en el cuadro III. Al

realizar un análisis de varianza de ambas muestras durante los 23 días de almacenamiento no se encontraron diferencias significativas con un nivel de significancia de 5%.

Cuadro III. Color del jugo de pitahaya con inulina y el control (sin inulina) inoculados con el probiótico *L. rhamnosus* LGG® durante el almacenamiento a 5 °C.

Color							
Día	L (C)		Hue		Croma		ΔE*
	Jugo + LGG + inulina	Jugo + LGG	Jugo + LGG + inulina	Jugo + LGG	Jugo + LGG + inulina	Jugo + LGG	
0	13,7±0,9	14±1	12,7±0,1	12,6±0,1	36±2	36±2	-
7	13,5±0,9	13,3±0,9	13,2±0,2	13,2±0,3	35±2	35±2	2±1
14	13±1	13,1±0,9	13,4±0,2	13,6±0,3	35±2	34±2	2,4±0,7
23	13,0±0,7	13±1	13,8±0,2	13,8±0,2	35±2	35±2	2,6±0,6

Resultados indican un promedio y una desviación estándar (±) para un n=3.

La importancia de determinar si existe cambio en el color del jugo de pitahaya al adicionar el probiótico y la inulina recae en la asociación perceptual del característico color rojizo en la pitahaya, el cual inclusive es utilizado como un colorante natural (Jalgaonkar *et al.*, 2020). La variación de color va a depender tanto de la matriz en la que se adicione el probiótico como por el probiótico adicionado, se ha demostrado que la presencia de *L. rhamnosus* LGG® en una bebida de mango y zanahoria no tuvo una influencia significativa en las medidas de color L*, a*, b* (de Oliveira *et al.*, 2021).

Debido a que el objetivo de este proyecto no fue la formulación final de una bebida probiótica a base de jugo de pitahaya, no se evaluó el perfil sensorial; sin embargo, para posteriores investigaciones se debe valorar si la inoculación de *L. rhamnosus* LGG® puede tener algún efecto significativo en el sabor del jugo de pitahaya.

Objetivo 3: “*Cuantificación del contenido de betalaínas en un jugo de pitahaya inoculado con los probióticos comerciales durante su almacenamiento en refrigeración para determinar la estabilidad de estos compuestos bioactivos.*”

Durante el desarrollo de los objetivos anteriores se analizó el contenido de betalaínas totales y betalaínas principales utilizando espectrofotometría y HPLC, respectivamente. En el cuadro IV se observan los resultados obtenidos durante el objetivo 1. Se realizaron 3 muestras: jugo de pitahaya sin inóculo de probiótico, el cual se tomó como muestra control, jugo de pitahaya con la inoculación de *L. rhamnosus* LGG® y jugo de pitahaya con la inoculación de *L. casei* 431. Mientras que en el cuadro V se muestran los resultados obtenidos durante el desarrollo del objetivo 2, en este caso la muestra control correspondió al jugo de pitahaya con la inoculación de *L. rhamnosus* LGG®, mientras que la otra muestra además contenía inulina.

Cuadro IV. Contenido de betalaínas en jugo de pitahaya inoculado con los probióticos *L. rhamnosus* LGG ®, *L. casei* 431 y control (jugo de pitahaya sin inocular) durante el almacenamiento a 5°C.

Día	Tratamiento	Parámetro					
		Betalainas totales (ug/mL)	Betanina	Isobetanina	Filocactina	Butirilbetanina	Hilocerina
0	Control	33,75±0,01	13±3	6,6±0,6	9±2	1,2±0,4	7±1
	<i>L. casei</i> 431	26,580±0,008	10,3±0,2	4±1	8,4±0,2	1,0±0,1	5,6±0,3
	LGG	31,21±0,01	11±2	4,8±0,8	9±1	1,16±0,01	6,6±0,9
2	Control	34,210±0,001	13±1	6,7±0,3	9,5±0,4	1,14±0,05	6,4±0,3
	<i>L. casei</i> 431	26,63±0,02	10,2±0,7	4,3±0,4	8±1	0,9±0,2	5,5±0,8
	LGG	NA*	NA	NA	NA	NA	NA
5	Control	32,32±0,004	12±1	6,3±0,3	9,0±0,4	1,0±0,1	5,7±0,4
	<i>L. casei</i> 431	26,07±0,002	11,0±0,8	4,5±0,2	6±2	0,97±0,07	5±1
	LGG	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7	Control	30,75±0,01	11±3	6,0±0,2	8±2	1,2±0,2	7±1
	<i>L. casei</i> 431	26,57±0,005	10±1	5,2±0,4	5±2	1,16±0,09	6,7±0,6
	LGG	32,61±0,01	12±2	5,2±0,5	9,6±0,4	1,23±0,05	6,9±0,5
9	Control	30,09±0,002	11±3	5,9±0,5	8±2	1,0±0,1	5,5±0,7
	<i>L. casei</i> 431	26,19±0,003	11±2	4,4±0,5	7±2	1,49±0,08	4,9±0,9
	LGG	NA	NA	NA	NA	NA	NA
14	Control	30,21±0,002	13±3	4,6±0,4	8±1	1,12±0,009	6,7±0,8
	<i>L. casei</i> 431	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	LGG	31,49±0,01	13±1	4,2±0,5	9,8±0,4	1,27±0,01	5,4±0,5
23	Control	28,910±0,003	11,6±0,5	4,6±0,3	7±1	0,91±0,05	5,0±0,6
	<i>L. casei</i> 431	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	LGG	27,250±0,0001	7±1	5,3±0,5	9,8±0,4	1,21±0,01	7,0±0,05

*NA: no aplica el resultado en punto de muestreo. Resultados indican un promedio y una desviación estándar (±) para un n=3.

Cuadro V. Contenido de las betalaínas totales y las principales del jugo de pitahaya con inulina y el control (sin inulina) inoculados con el probiótico *L. rhamnosus* LGG® durante el almacenamiento a 5 °C.

Contenido de betalaína (ug/mL)	Tratamiento	Día de almacenamiento		
		0	7	23
Contenido total de betalaínas	Jugo + LGG + inulina	30,62±0,08	24,11±0,08	26,75±0,08
	Jugo + LGG	31±6	23,88±0,08	27±7
Betanina	Jugo + LGG + inulina	5,5±0,7	4,2±0,6	4,3±0,5
	Jugo + LGG	6,2±0,4	5±1	5±1
Isobetanina	Jugo + LGG + inulina	5,0±0,8	4,0±0,3	4,0±0,3
	Jugo + LGG	5,1±0,6	4,1±0,3	4,2±0,3
Filocactina	Jugo + LGG + inulina	14±6	12±6	11±6
	Jugo + LGG	14±6	11±6	11±6
Butirilbetanina	Jugo + LGG + inulina	1,2±0,4	0,9±0,4	0,8±0,4
	Jugo + LGG	1,329±0,001	0,992±0,001	0,9320±0,004
Hilocerenina	Jugo + LGG + inulina	8±1	6,4±0,6	6,4±0,6
	Jugo + LGG	8±1	6,4±0,6	6,4±0,6

Resultados indican un promedio y desviación estándar (±) para un n=3.

Las betalaínas identificadas en los cuadros IV y V fueron cuantificadas por medio del área bajo la curva de los picos obtenidos en el cromatograma de HPLC utilizando una longitud de onda de 536 nm y determinando su concentración en ug/mL. La concentración total fue obtenida por espectrofotometría donde se toma en cuenta la absorbancia, el coeficiente de extinción molar, y el peso molecular de la betanina (Castellanos-Santiago & Yahia, 2008). Los picos principales fueron

comparados con los encontrados en la literatura, confirmando que los mismos correspondían a betanina, isobetanina, filocactina, butirilbetanina e hilocerenina (Stintzing et al., 2002).

Para el cuadro IV, el mayor contenido de betalaínas lo presenta la muestra control, seguido de la muestra con *L. rhamnosus* LGG® y por último la muestra con *L. casei* 431. Además, durante los puntos de muestreo a través del tiempo se observó una leve disminución del contenido de betalaínas en la mayoría de los puntos y las muestras. Se realizó un ANDEVA y se determinó que no existen diferencias significativas en el contenido de las betalinas totales ni en el contenido de betanina, isobetanina, filocactina, butirilbetanina e hilocerenina con respecto a la muestra control y a las muestras inoculadas con probióticos, lo anterior con un 5% de significancia.

Con respecto a los resultados obtenidos en el cuadro V, no se logra ver una tendencia al comparar los resultados de la muestra control con la muestra que se le adicionó inulina, al realizar un ANDEVA no se identificaron diferencias significativas en el contenido de betalaínas totales ni en el contenido de betanina, isobetanina, filocactina, butirilbetanina e hilocerenina con respecto a la muestra control y a la muestra con adición de inulina, lo anterior con un 5% de significancia.

Se sabe que la proporción de betacianinas y betaxantinas presentes en la pitahaya influyen drásticamente en el color del fruto, por ejemplo, en el caso de la pitahaya con pigmentación rojo-violeta, como la utilizada en esta investigación, se realizó un análisis en las betacianinas ya que se presentan en mayor cantidad que las betaxantinas (Stintzing *et al.*, 2005). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos ya que las betalaínas presentes en mayor cantidad corresponden a las betacianinas. Además, se ha encontrado que para *H. polyrhizus* las betaninas y las filocactinas se encuentran en una mayor proporción, lo anterior concuerda con los resultados del objetivo 1; sin embargo, en el objetivo 2 la hilocerenina se encuentra presente en mayor proporción que la betanina. Importante destacar que la proporción de betalaínas puede variar de acuerdo con muchos factores; por ejemplo, degradación y especies (García-Cruz *et al.*, 2017).

La importancia de evaluar la degradación de las betalaínas durante el almacenamiento yace en la inestabilidad de las mismas a factores como: actividad del agua, pH, concentración de oxígeno, exposición a altas temperaturas y exposición a la luz; siendo la exposición a la luz y a la temperatura los principales factores que podrían causar degradación en el desarrollo de una bebida probiótica de jugo de pitahaya (Vergara Hinostroza, 2013). Además, en este proyecto fue de

relevancia analizar si la adición de probióticos e inulina generarían un efecto negativo o positivo en las betalaínas.

Se ha demostrado que bajo condiciones de ausencia de luz existe una mayor estabilidad de las betalaínas (Sánchez & Bernabé, 2010). Durante esta investigación, el jugo fue almacenado en tubos de ensayo de vidrio con el fin de que estuvieran expuestos a la luz y de esta forma poder semejar condiciones reales del mercado, ya que uno de los mayores atractivos de esta fruta es su color, por ende, el desarrollo de una bebida de pitahaya podría contemplarse comercializarse en un envase de vidrio que lo exponga a la luz. Sin embargo, en esta investigación no se presentó una variación del color por degradación de las betalaínas expuestas a la luz. En caso de presentarla, existen estudios que demuestran que la adición de sustancias como el ácido cítrico o ácido ascórbico puede aumentar la estabilidad de las betalaínas además de un almacenamiento a temperaturas de 5 °C (Flores-Mancha *et al.*, 2019; Hernández & Salazar, 2017).

Por otro lado, al realizar pruebas preliminares al inicio de esta investigación se determinó por medio de espectrofotometría y HPLC que el tratamiento térmico aplicado al jugo de pitahaya no tuvo un efecto significativo en la concentración de betalaínas; sin embargo, de acuerdo a la literatura, temperaturas de 50 °C podrían tener un impacto significativo en la disminución del contenido de betalaínas (Sánchez-Chávez *et al.*, 2015). Es por esto, que al desarrollar un producto con betalaínas se debe analizar el efecto de los tratamientos térmicos en su estabilidad. Tal es el caso de una investigación la cual realizó un tratamiento térmico a 63 °C por 30 minutos en yogurt de pitahaya el cual determinó que estas temperaturas no tuvieron un efecto significativo en la concentración final de betalaínas (Hernández & Salazar, 2017). Además, luego de la pasteurización se obtiene una mayor retención de las betacianinas en temperaturas de refrigeración 5 °C comparado a temperaturas ambiente 25 °C (Ramírez *et al.*, 2018).

La adición de probióticos al jugo de pitahaya pudo provocar una disminución en el contenido de betalaínas ya que su presencia pudo haber causado una disminución en el pH y al exponerse a pH menor a 3,0 las betalaínas se degradan perdiendo su color (Flores-Mancha *et al.*, 2019). A nivel experimental el pH se mantuvo constante luego de la adición de los probióticos y el contenido de betalaínas no se afectó significativamente. Aunado a la adición de probióticos, no se encontró en la literatura algún efecto en la degradación de las betalaínas ocasionado por probióticos como la inulina, por lo contrario, la inulina ha sido utilizada como agente encapsulante

para betalaínas obtenidas de remolacha y de esta forma evitar la degradación de las mismas aumentando su estabilidad (Flores-Mancha *et al.*, 2019).

Los resultados obtenidos arrojan descubrimientos positivos para el futuro desarrollo de una bebida probiótica de jugo de pitahaya, ya que el no existir una degradación del contenido de betalaínas se encuentra un beneficio tanto comercial como funcional. A nivel comercial, el color rojizo que proporcionan las betalaínas es un gran atractivo para el consumidor, por lo que es posible comercializarlo en un recipiente de vidrio que permita mostrar el atrayente color sin que el mismo se degrade durante su vida útil. Por otro lado, la adición de probióticos y prebióticos como la inulina no comprometen las propiedades funcionales presentes en el jugo de pitahaya, otorgadas principalmente por la capacidad antioxidante de las betalaínas (Gengatharan *et al.*, 2015).

6. Conclusiones

La especie *L. rhamnosus* LGG® presentó una mejor viabilidad a las condiciones de pH del jugo de pitahaya de $3,78 \pm 0,04$, logrando mantenerse por encima de 9 UFC/mL por 7,95 días mientras que *L. casei* 431, solo se mantuvo por 0,37 días. El uso de un prebiótico, en este caso inulina, en jugo de pitahaya inoculado con *L. rhamnosus* LGG® no tuvo un efecto significativo en la concentración del probiótico durante el tiempo de almacenamiento a 5 °C. Por otro lado, el contenido de betalaínas totales y betalaínas específicas medidos por espectrofotometría y HPLC respectivamente no se vieron afectados significativamente durante el tiempo de almacenamiento para ninguno de los dos probióticos, ni al adicionar inulina lo cual indica un aspecto positivo para una potencial bebida probiótica. De igual forma, el pH, contenido de sólidos solubles y el color no se vio afectado significativamente a lo largo del tiempo durante el análisis de la muestra control de jugo de pitahaya inoculado con *L. rhamnosus* LGG® ni de la muestra con adición de inulina logrando mantener las características fisicoquímicas estables.

7. Recomendaciones

Realizar una formulación de una bebida de jugo de pitahaya y analizar si la adición de otros ingredientes tiene un efecto positivo en la sobrevivencia de *L. rhamnosus* LGG®. Además, si la adición de este probiótico tiene un efecto en el perfil sensorial. Para lo anterior se debe realizar un estudio de vida útil de una bebida de jugo de pitahaya inoculada con *L. rhamnosus* LGG®. Es ideal estudiar el efecto de otros prebióticos diferentes a la inulina, principalmente de cadena

mediana o larga, en el jugo de pitahaya inoculado con *L. rhamnosus* LGG® a través del tiempo. Para determinar la viabilidad de *L. casei* 431® se recomienda estudiar el efecto de la adición de prebióticos tal y como se realizó con *L. rhamnosus* LGG®.

8. Bibliografía

Abangares, M. de. (2019). *Municipalidad de Abangares - Ficha técnica Proyecto Pitaya*.

<http://www.abangares.go.cr/index.php/mn-gestionmunicipal/descubre-abangares/proyecto-pitaya>

Al-Mekhlafi, N. A., Mediani, A., Ismail, N. H., Abas, F., Dymerski, T., Lubinska-Szczygeł, M., Vearasilp, S., & Gorinstein, S. (2021). Metabolomic and antioxidant properties of different varieties and origins of Dragon fruit. *Microchemical Journal*, 160, 105687. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105687>

Alwis, A. D. P. S., Perera, O. D. A. N., & Weerahewa, H. L. D. (2016). Development of a Novel Carrot-based Synbiotic Beverage. *11*(3), 178–185.

Amanda, E., & Choo, W. S. (2018). Effect of refrigerated storage on the physicochemical characteristics and viability of *Lactobacillus plantarum* in fermented watermelon juice with or without supplementation with inulin or fructooligosaccharide. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(12), 1–8. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13831>

Andrade, R., Santos, E., Azoubel, P., & Ribeiro, E. (2019). Increased survival of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in guava juices with simulated gastrointestinal conditions during refrigerated storage. *Food Bioscience*, 32(September 2018), 100470. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100470>

Antigo, J. L. D., Bergamasco, R. de C., & Madrona, G. S. (2018). Effect of ph on the stability of red beet extract (*Beta vulgaris* L.) microcapsules produced by spray drying or freeze drying. *Food Science and Technology*, 38(1), 72–77. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.34316>

Arivalagan, M., Karunakaran, G., Roy, T. K., Dinsha, M., Sindhu, B. C., Shilpashree, V. M., Satisha, G. C., & Shivashankara, K. S. (2021). Biochemical and nutritional characterization of dragon fruit (*Hylocereus species*). *Food Chemistry*, 353, 129426. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129426>

- Aspri, M., Papademas, P., & Tsaltas, D. (2020). Review on Non-Dairy Probiotics and Their Use in Non-Dairy Based Products. *Fermentation*, 6(1), 30. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010030>
- Avalo, B., Pérez, S., & Tovar, M. (2009). Caracterización preliminar del proceso de concentración del jugo natural de naranja en un evaporador de tres efectos. *Interciencia*, 34(11), 784–790. https://www.researchgate.net/publication/46406414_Caracterizacion_preliminar_del_proceso_de_concentracion_del_jugo_natural_de_naranja_en_un_evaporador_de_tres_efectos
- Bagon, B. B., Valeriano, V. D. V., Oh, J. K., Pajarillo, E. A. B., Cho, C. S., & Kang, D. K. (2018). Comparative exoproteome analyses of *Lactobacillus* spp. reveals species- and strain-specific proteins involved in their extracellular interaction and probiotic potential. *Lwt*, 93(December 2017), 420–426. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.069>
- Bassama, J., Tamba, A., Ndong, M., Sarr, K. D. D., & Cissé, M. (2021). Degradation kinetics of betacyanins during the pasteurization and storage of cactus pear (*Opuntia dillenii haw.*) juice using the arrhenius, eyring, and ball models. *Beverages*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.3390/beverages7010002>
- BENEIO. (2019). *BENEIO* – connecting nutrition and health. <https://orafti.cl/sitio/>
- Bernal, C. A., Díaz, C., & Gutiérrez, C. (2017). Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas. In *Revista Chilena de Nutricion* (Vol. 44, Issue 4, pp. 383–392). Sociedad Chilena de Nutricion Bromatologia y Toxologica. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182017000400383>
- Castellanos-Santiago, E., & Yahia, E. M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5758–5764. <https://doi.org/10.1021/jf800362t>
- Castillo-Escandón, V., Fernández-Michel, S. G., Cueto- Wong, M. C., & Ramos-Clamont Montfort, G. (2019). Criterios y estrategias tecnológicas para la incorporación y supervivencia de probióticos en frutas, cereales y sus derivados. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 22, 1–17.

<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.173>

- Castro-Enríquez, D. D., Montaña-Leyva, B., Del Toro-Sánchez, C. L., Juaréz-Onofre, J. E., Carvajal-Millan, E., Burruel-Ibarra, S. E., Tapia-Hernández, J. A., Barreras-Urbina, C. G., & Rodríguez-Félix, F. (2019). Stabilization of betalains by encapsulation—a review. *Journal of Food Science and Technology* 2019 57:5, 57(5), 1587–1600. <https://doi.org/10.1007/S13197-019-04120-X>
- Cheok, A., George, T. W., Rodriguez-Mateos, A., & Caton, P. W. (2020). The effects of betalain-rich cacti (dragon fruit and cactus pear) on endothelial and vascular function: A systematic review of animal and human studies. *Food and Function*, 11(8), 6807–6817. <https://doi.org/10.1039/d0fo00537a>
- Choo, W. S. (2019). Betalains: Application in Functional Foods. *Reference Series in Phytochemistry*, 1471–1498. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6_38
- CODEX. (2018). E Agenda Item 11 CX/NFSDU 18/40/12 JOINT FAO/WHO Food standards programme CODEX Committee on nutrition and foods for special dietary uses Fortieth Session. *FAO/WHO*.
- de Almeida, R. C., Martins, E. M. F., de Andrade Pires, B., do Carmo Gouveia Peluzio, M., da Rocha Campos, A. N., Ramos, A. M., de Castro Leite Júnior, B. R., de Oliveira Martins, A. D., da Silva, R. R., & Martins, M. L. (2019). In vitro and in vivo resistance of *Lactobacillus rhamnosus* GG carried by a mixed pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) and jussara (*Euterpe edulis* Martius) juice to the gastrointestinal tract. *Food Research International*, 116(October), 1247–1257. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.012>
- de Oliveira, P. M., Leite Júnior, B. R. de C., Martins, E. M. F., Martins, M. L., Vieira, É. N. R., de Barros, F. A. R., Cristianini, M., de Almeida Costa, N., & Ramos, A. M. (2021). Mango and carrot mixed juice: a new matrix for the vehicle of probiotic lactobacilli. *Journal of Food Science and Technology*, 58(1), 98–109. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04518-y>
- de Oliveira Ribeiro, A. P., Gomes, F. dos S., Maria Olbrich dos Santos, K., da Matta, V. M., Freitas de Sá, D. de G. C., Santiago, M. C. P. de A., Conte, C., de Oliveira Costa, S. D., Oliveira Ribeiro, L. de, de Oliveira Godoy, R. L., & Walter, E. H. M. (2020). Development of a

probiotic non-fermented blend beverage with juçara fruit: Effect of the matrix on probiotic viability and survival to the gastrointestinal tract. *Lwt*, 118, 108756. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108756>

Dias, C. O., dos Santos Opuski de Almeida, J., Pinto, S. S., de Oliveira Santana, F. C., Verruck, S., Müller, C. M. O., Prudêncio, E. S., & de Mello Castanho Amboni, R. D. (2018). Development and physico-chemical characterization of microencapsulated bifidobacteria in passion fruit juice: A functional non-dairy product for probiotic delivery. *Food Bioscience*, 24, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.05.006>

Dimitrovski, D., Dimitrovska-Vetadjoka, M., Hristov, H., & Doneva-Shapceska, D. (2021). Developing probiotic pumpkin juice by fermentation with commercial probiotic strain *Lactobacillus casei* 431. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(3), 1–9. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15245>

Esquivel, P., & Araya, Y. (2012). Características del fruto de la pitahaya (*Hylocereus* sp.) y su potencial de uso en la industria alimentaria. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 113–129. http://www.rvcta.org/Publicaciones/Vol3Num1/ArchivosV3N1/Esquivel_Patricia_y_Araya-Quesada_RVCTA-V3N1.pdf

FAO/WHO. (2006). Probiotics in food. *Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation - Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*, 413–426. <https://doi.org/10.1201/9781420009613.ch16>

Farid Hossain, M., Numan, S. M., & Akhtar, S. (2021). Cultivation, Nutritional Value and Health Benefits of Dragon Fruit (*Hylocereus* spp.): A Review. *International Journal of Horticultural Science and Technology Journal Homepage*, 8(3), 259–269. <http://ijhst.ut.ac.ir>

FDA. (2007). *Guidance for Industry: Refrigerated Carrot Juice and Other Refrigerated Low-Acid Juices* | FDA. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-refrigerated-carrot-juice-and-other-refrigerated-low-acid-juices>

- Figueroa-gonzález, I., Rodríguez-serrano, G., Hernández-sánchez, H., Jiménez-, J., Gómez-ruiz, L., Cruz-guerrero, M. G. A., Biotecnología, D. De, Metropolitana-iztapalapa, U. A., Nacional, E., & Biológicas, D. C. (2005). Efecto de prebióticos en el crecimiento de probióticos. *71*(11), 9340.
- Flores-Mancha, M. A., Rentería-Monterrubio, A. L., Sánchez-Vega, R., & Chávez-Martínez, A. (2019). Estructura y estabilidad de las Betalaínas. *Interciencia, Vol.44*(6), 318-325 pp.
- Gamage, S. M., Mihirani, M. K. S., Perera, O. D. A. N., & Weerahewa, H. L. D. (2016). Development of synbiotic beverage from beetroot juice using beneficial probiotic *Lactobacillus casei* 431. *Ruhuna Journal of Science, 7*(2), 64. <https://doi.org/10.4038/rjs.v7i2.20>
- Garbanzo-León, G., Chavarría-Pérez, G., & Vega-Villalobos, E. V. (2019). Allometric correlation in *Hylocereus costaricensis* y *H. monacanthus* (Pitahaya): A tool to quantify growth. *Agronomy Mesoamerican, 30*(2), 425–436. <https://doi.org/10.15517/am.v30i2.33574>
- García-Cruz, L., Dueñas, M., Santos-Buelgas, C., Valle-Guadarrama, S., & Salinas-Moreno, Y. (2017). Betalains and phenolic compounds profiling and antioxidant capacity of pitaya (*Stenocereus* spp.) fruit from two species (*S. pruinosus* and *S. stellatus*). *Food Chemistry, 234*, 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.174>
- Gengatharan, A., Dykes, G. A., & Choo, W. S. (2015). Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *Lwt, 64*(2), 645–649. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.052>
- Hakim, A. L. R., Ambardini, R. L., Nugroho, W. A., & Burhaein, E. (2018). Dragon Fruit Giving Effect Against Malondealdehyde (MDA) Levels in Muay Thai Athletes With High Intensity Interval Training (HIIT) Method. *8*(10), 190–198. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1472726>
- Hernandez-Garcia, J. (2019). Evaluación in vitro del potencial probiótico de *Lactobacillus acidophilus* SS80 y *Streptococcus thermophilus* SS77. *Revista de Salud Animal, 41*(1). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0253-570X2019000100001&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Hernández, G. y, & Salazar, M. (2017). Efecto de las betalaínas y fenoles solubles totales de

pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) como antioxidantes en yogur. 28.

- How, Y., & Pui, L. (2021). Survivability of microencapsulated probiotics in nondairy beverages: A review. In *Journal of Food Processing and Preservation* (Vol. 45, Issue 7). <https://doi.org/10.1111/jfpp.15641>
- Huachi, L., Yugsi, E., Paredes, M., Coronel, D., Verdugo, K., & Coba Santamaría, P. (2015). Desarrollo de la pitahaya (*Cereus* sp.) En Ecuador. *La Granja: Revista de Ciencias de La Vida*, 22(2), 50–58. <https://doi.org/10.17163/lgr.n22.2015.05>
- ISAPP. (2020). *ISAPP Science - International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP)*. <https://isappscience.org/>
- Jalgaonkar, K., Mahawar, M. K., Bibwe, B., & Kannaujia, P. (2020). Postharvest Profile, Processing and Waste Utilization of Dragon Fruit (*Hylocereus* spp.): A Review. *Food Reviews International*, 00(00), 1–27. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1742152>
- James, A., & Wang, Y. (2019). Characterization, health benefits and applications of fruits and vegetable probiotics. *CYTA - Journal of Food*, 17(1), 770–780. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1652693>
- Jiang, X., Lu, Y., & Liu, S. Q. (2020). Effects of pectinase treatment on the physicochemical and oenological properties of red dragon fruit wine fermented with *Torulaspora delbrueckii*. *Lwt*, 132(July), 109929. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109929>
- Kandylis, P., Pissaridi, K., Bekatorou, A., Kanellaki, M., & Koutinas, A. A. (2016). Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Current Opinion in Food Science*, 7, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.012>
- Kaur, G., Thawkar, B., Dubey, S., & Jadhav, P. (2018). Pharmacological potentials of betalains. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 15(3). <https://doi.org/10.1515/JCIM-2017-0063>
- Khan, M. I. (2016). Stabilization of betalains: A review. *Food Chemistry*, 197, 1280–1285. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.043>
- Lillo-Pérez, S., Guerra-Valle, M., Orellana-Palma, P., & Petzold, G. (2021). Probiotics in fruit and

pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) como antioxidantes en yogur. 28.

- How, Y., & Pui, L. (2021). Survivability of microencapsulated probiotics in nondairy beverages: A review. In *Journal of Food Processing and Preservation* (Vol. 45, Issue 7). <https://doi.org/10.1111/jfpp.15641>
- Huachi, L., Yugsi, E., Paredes, M., Coronel, D., Verdugo, K., & Coba Santamaría, P. (2015). Desarrollo de la pitahaya (*Cereus* sp.) En Ecuador. *La Granja: Revista de Ciencias de La Vida*, 22(2), 50–58. <https://doi.org/10.17163/lgr.n22.2015.05>
- ISAPP. (2020). *ISAPP Science - International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP)*. <https://isappscience.org/>
- Jalgaonkar, K., Mahawar, M. K., Bibwe, B., & Kannaujia, P. (2020). Postharvest Profile, Processing and Waste Utilization of Dragon Fruit (*Hylocereus* spp.): A Review. *Food Reviews International*, 00(00), 1–27. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1742152>
- James, A., & Wang, Y. (2019). Characterization, health benefits and applications of fruits and vegetable probiotics. *CYTA - Journal of Food*, 17(1), 770–780. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1652693>
- Jiang, X., Lu, Y., & Liu, S. Q. (2020). Effects of pectinase treatment on the physicochemical and oenological properties of red dragon fruit wine fermented with *Torulaspora delbrueckii*. *Lwt*, 132(July), 109929. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109929>
- Kandylis, P., Pissaridi, K., Bekatorou, A., Kanellaki, M., & Koutinas, A. A. (2016). Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Current Opinion in Food Science*, 7, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.012>
- Kaur, G., Thawkar, B., Dubey, S., & Jadhav, P. (2018). Pharmacological potentials of betalains. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 15(3). <https://doi.org/10.1515/JCIM-2017-0063>
- Khan, M. I. (2016). Stabilization of betalains: A review. *Food Chemistry*, 197, 1280–1285. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.043>
- Lillo-Pérez, S., Guerra-Valle, M., Orellana-Palma, P., & Petzold, G. (2021). Probiotics in fruit and

- vegetable matrices: Opportunities for nondairy consumers. *Lwt*, 151(July). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112106>
- Liu, B., Ye, C., Geng, L., & Zhou, W. (2019). Betacyanins in dragon fruit peels: the kinetic models of their degradation under different treatment conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(10), 2949–2962. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14206>
- Mahayothee, B., Komonsing, N., Khuwijitjaru, P., Nagle, M., & Müller, J. (2019). Influence of drying conditions on colour, betacyanin content and antioxidant capacities in dried red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *International Journal of Food Science and Technology*, 54(2), 460–470. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13958>
- Mahdavi, S., Chalabi, P., Zomorodi, S., & Isazadeh, A. (2018). Effect of banana puree on the survival of *Lactobacillus casei* in banana and apple juice cocktail during storage. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 4(2), 23–27. <https://doi.org/10.18502/pbr.v4i2.217>
- Manihuruk, F. M., Suryati, T., & Arief, I. I. (2017). Effectiveness of the red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel extract as the colorant, antioxidant, and antimicrobial on beef sausage. *Media Peternakan*, 40(1), 47–54. <https://doi.org/10.5398/medpet.2017.40.1.47>
- Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- McFarland, L. V., & Goh, S. (2019). Are probiotics and prebiotics effective in the prevention of travellers' diarrhea: A systematic review and meta-analysis. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 27(September), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2018.09.007>
- Miguel, M. G. (2018). Betalains in some species of the amaranthaceae family: A review. *Antioxidants*, 7(4), 1–33. <https://doi.org/10.3390/antiox7040053>
- Min, M., Bunt, C. R., Mason, S. L., & Hussain, M. A. (2019). Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(16), 2626–2641. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1462760>
- Montero-Zamora, J., Cortés-Muñoz, M., Esquivel, P., Mora-Villalobos, J. A., & Velázquez, C. (2020). Growth conditions and survival kinetics during storage of *Lactobacillus rhamnosus*

GG for the design of a sustainable probiotic whey-based beverage containing Costa Rican guava fruit pulp. *Journal of Food Science*, 85(10), 3478–3486. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15430>

Muhaladin, B. J., Kadum, H., Zarei, M., & Meor Hussin, A. S. (2020). Effects of metabolite changes during lacto-fermentation on the biological activity and consumer acceptability for dragon fruit juice. *Lwt*, 121(December 2019), 108992. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108992>

Munekata, P. E. S., Domínguez, R., Budaraju, S., Roselló-Soto, E., Barba, F. J., Mallikarjunan, K., Roohinejad, S., & Lorenzo, J. M. (2020). Effect of innovative food processing technologies on the physicochemical and nutritional properties and quality of non-dairy plant-based beverages. *Foods*, 9(3), 1–16. <https://doi.org/10.3390/foods9030288>

Nerdy, N., & Manurung, K. (2018). Spectrophotometric method for antioxidant activity test and total phenolic determination of red dragon fruit leaves and white dragon fruit leaves. *Rasayan Journal of Chemistry*, 11(3), 1183–1192. <https://doi.org/10.31788/RJC.2018.1134018>

Nguyen, B. T., Bujna, E., Fekete, N., Tran, A. T. M., Rezessy-Szabo, J. M., Prasad, R., & Nguyen, Q. D. (2019). Probiotic beverage from pineapple juice fermented with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Frontiers in Nutrition*, 6(May), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00054>

Olivares, A., Soto, C., Caballero, E., & Altamirano, C. (2019). Survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* (prepared by vibration technology) in fruit juice during cold storage. *Electronic Journal of Biotechnology*, 42, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.10.002>

Otárola, P. (2020). Pitahaya de Ecuador espera abrir nuevos mercados - Procomer Costa Rica. https://www.procomer.com/alertas_comerciales/exportador-alerta/pitahaya-de-ecuador-espera-abrir-nuevos-mercados/

Padilla, A. (2012). Universidad de Costa Rica Facultad de Ciencias Agroalimentarias Escuela de Tecnología de Alimentos Caracterización química y física de la pared celular de los polisacáridos del tallo de la pitahaya (*Hylocereus* sp.) para su potencial uso industrial y eva. Universidad de Costa Rica.

- Pansai, N., Chakree, K., Takahashi Yupanqui, C., Raungrut, P., Yanyiam, N., & Wichienchot, S. (2020). Gut microbiota modulation and immune boosting properties of prebiotic dragon fruit oligosaccharides. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(1), 55–64. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14230>
- Patel, A. R. (2017). Probiotic fruit and vegetable juices-recent advances and future perspective. *International Food Research Journal*, 24(5), 1850–1857.
- PATICA. (2021). *Patica Products Costa Rica*. <https://paticacr.com/>
- Perricone, M., Bevilacqua, A., Altieri, C., Sinigaglia, M., & Corbo, M. (2015). Challenges for the Production of Probiotic Fruit Juices. *Beverages*, 1(2), 95–103. <https://doi.org/10.3390/beverages1020095>
- Poolsup, N., Suksomboon, N., Kurnianta, P. D. M., & Deawjaroen, K. (2019). Effects of curcumin on glycemic control and lipid profile in prediabetes and type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 14(4), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215840>
- Porto, M. R. A., Okina, V. S., Pimentel, T. C., Garcia, S., & Prudencio, S. H. (2018). Beet and orange mixed juices added with *Lactobacillus acidophilus*. *Nutrition and Food Science*, 48(1), 76–87. <https://doi.org/10.1108/NFS-06-2017-0108>
- Pravst, I. (2012). Functional Foods in Europe: A Focus on Health Claims. *Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry*. <https://doi.org/10.5772/31057>
- PROCOMER. (2021). Pitahaya de Ecuador espera abrir nuevos mercados - Procomer Costa Rica. https://www.procomer.com/alertas_comerciales/exportador-alerta/pitahaya-de-ecuador-espera-abrir-nuevos-mercados/
- Ramírez, C. (2009). Efecto del procesamiento sobre la estabilidad de una pulpa pasteurizada de pitaya (*Hylocereus sp.*) durante el almacenamiento. Universidad de Costa Rica.
- Ramírez, C., Esquivel, P., Araya, Y., Jiménez, V., & Carle, R. (2018). Estabilidad de las betalainas en una pulpa pasteurizada de pitaya (*Hylocereus sp.*). *Cigras, August*, 1–2.
- Ray, S., & Dasgupta, A. K. (2014). Probiotics as cheater cells: Parameter space clustering for

- individualized prescription. *Journal of Theoretical Biology*, 361, 165–174.
<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2014.07.019>
- Reygagne, P., Bastien, P., Couavoux, M. P., Philippe, D., Renouf, M., Castiel-Higounenc, I., & Gueniche, A. (2017). The positive benefit of *Lactobacillus paracasei* NCC2461 ST11 in healthy volunteers with moderate to severe dandruff. *Beneficial Microbes*, 8(5), 671–680.
<https://doi.org/10.3920/BM2016.0144>
- Rodriguez, E. B., Vidallon, M. L. P., Mendoza, D. J. R., & Reyes, C. T. (2016). Health-promoting bioactivities of betalains from red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton and Rose) peels as affected by carbohydrate encapsulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(14), 4679–4689. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7681>
- Rojas De Miguel, G. (2012). Comparación de dos métodos para la producción de pulpa de pitaya (*Hylocereus* sp.) en polvo para que sean utilizadas como ingrediente colorante en alimentos. Universidad de Costa Rica.
- Rondon, L. (2015). Probióticos: generalidades. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*, 78(4), 123–128. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0004-06492015000400006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., & Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of Nutrition*, 57(1), 0. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8>
- RTCR. (2008). *Reglamento Técnico RTCR 414 : 2008 Yogurt para Consumo Directo N° 35084-MEIC-MAG-S*. 1–37.
- Sánchez-Chávez, W., Cortez-Arredondo, J., Solano-Cornejo, M., & Vidaurre-Ruiz, J. (2015). Kinetics of thermal degradation of betacyanins, betaxantins and vitamin C in a juice-based drink beet (*Beta vulgaris* l.) and honey. *Scientia Agropecuaria*, 6(2), 111–118.
<https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.02.03>
- Sánchez, G., & Bernabé, S.-. (2010). Efecto de la temperatura y luminosidad sobre la estabilidad de las betalaínas obtenidas de “betarraga.” *Sciéndo*, 13(2).
- Sánchez, L., Vichi, J., Llanes, M., Castro, E., Soler, D., Espinosa, I., Kociubinski, G., & Ferreira,

- C. (2011). Aislamiento y caracterización *in vitro* de cepas de *Lactobacillus* spp. como candidato a probióticas. *Revista de Salud Animal*, 33(3), 154–160.
- Sangkuanun, T., Wichienchot, S., Kato, Y., Watanabe, H., & Peerakietkhajorn, S. (2020). Oligosaccharides derived from dragon fruit modulate gut microbiota, reduce oxidative stress and stimulate toll-pathway related gene expression in freshwater crustacean *Daphnia magna*. *Fish and Shellfish Immunology*, 103(January), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.04.046>
- Segers, M. E., & Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. *Microbial Cell Factories*, 13(Suppl 1), S7. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S7>
- Sengun, I. Y., Kirmizigul, A., Atlama, K., & Yilmaz, B. (2020). The viability of *Lactobacillus rhamnosus* in orange juice fortified with nettle (*Urtica dioica* L.) and bioactive properties of the juice during storage. *Lwt*, 118, 108707. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108707>
- Shori, A. B. (2016). Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. *Food Bioscience*, 13, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.11.001>
- Siow, L. F., & Wong, Y. M. (2017). Effect of juice concentration on storage stability, betacyanin degradation kinetics, and sensory acceptance of red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) juice. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 623–632. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1172086>
- Slimen, I. B., Najjar, T., & Abderrabba, M. (2017). Chemical and antioxidant properties of betalains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(4), 675–689. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04208>
- Song, H., Chu, Q., Xu, D., Xu, Y., & Zheng, X. (2015). Purified Betacyanins from *Hylocereus undatus* Peel Ameliorate Obesity and Insulin Resistance in High-Fat-Diet-Fed Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(1), 236–244. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.5B05177>
- Stintzing, F. C., Herbach, K. M., Mosshammer, M. R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., Akoh, C.

- C., Bunch, R., & Felker, P. (2005). Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia spp.*) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(2), 442–451. <https://doi.org/10.1021/jf048751y>
- Stintzing, F. C., Schieber, A., & Carle, R. (2002). Betacyanins in fruits from red-purple pitaya, *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose. *Food Chemistry*, 77(1), 101–106. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00374-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00374-0)
- Suarez Ospina, D., & Morales Hernández, Y. (2018). Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas basic principles of high performance liquid chromatography for the separation and analysis of mixtures. *América Revista Semilleros: Formación Investigativa*, 4.
- Szajewska, H., & Hojsak, I. (2020). Health benefits of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis subspecies lactis* BB-12 in children. *Postgraduate Medicine*, 132(5), 441–451. <https://doi.org/10.1080/00325481.2020.1731214>
- Tayo, B. A., & Akpeji, S. (2016a). Probiotic viability, physicochemical and sensory properties of probiotic pineapple juice. *Fermentation*, 2(4). <https://doi.org/10.3390/fermentation2040020>
- Tayo, B. A., & Akpeji, S. (2016b). Probiotic viability, physicochemical and sensory properties of probiotic pineapple juice. In *Fermentation* (Vol. 2, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/fermentation2040020>
- Trachootham, D., Chupeerach, C., Tuntipopipat, S., Pathomyok, L., Boonnak, K., Praengam, K., Promkam, C., & Santivarangkna, C. (2017). Drinking fermented milk containing *Lactobacillus paracasei* 431 (IMULUS™) improves immune response against H1N1 and cross-reactive H3N2 viruses after influenza vaccination: A pilot randomized triple-blinded placebo controlled trial. *Journal of Functional Foods*, 33, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.016>
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9(1), 225–241. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>
- Ulloa, E. (2017). Oportunidades de comercialización de productos agrícolas incipientes.

<http://servicios.procomer.go.cr/aplicacion/civ/documentos/Oportunidades> de
comercialización de productos agrícolas incipientes-Informe.pdf

- Vargas, L. A., Olson, D. W., & Aryana, K. J. (2015). Whey protein isolate improves acid and bile tolerances of *Streptococcus thermophilus* ST-M5 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp: *Bulgaricus* LB-12. *Journal of Dairy Science*, 98(4), 2215–2221. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8869>
- Vergara Hinojosa, C. (2013). Extracción y estabilización de betalainas de tuna púrpura (*Opuntia ficus-indica*) mediante tecnología de membranas y microencapsulación, como colorante alimentario. <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/114868>
- Verona-Ruiz, A., Urcia-Cerna, J., & Paucar-Menacho, L. M. (2020). Pitahaya (*Hylocereus spp.*): Culture, physicochemical characteristics, nutritional composition, and bioactive compounds. *Scientia Agropecuaria*, 11(3), 439–453. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.16>
- Vicentini, A., Liberatore, L., & Mastrocola, D. (2016). Functional foods: Trends and Development of the global market. *Italian Journal of Food Science*, 28(2), 338–351. <https://doi.org/10.14674/1120-1770/IJFS.V211>
- Vizcaíno, R., Macías-Tomei, C., Márquez, J., Morales, A., & Torres, N. (2016). Usos clínicos de los probióticos. 79(1). http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06492016000100007
- Vodnar, D. C., Calinoiub, L. F., Mitrea, L., Precup, G., Bindea, M., Pacurar, A. M., Szabo, K., & Stefanescu, B. E. (2019a). A new generation of probiotic functional beverages using bioactive compounds from agro-industrial waste. In *Functional and Medicinal Beverages: Volume 11: The Science of Beverages*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816397-9.00015-7>
- Vodnar, D. C., Calinoiub, L. F., Mitrea, L., Precup, G., Bindea, M., Pacurar, A. M., Szabo, K., & Stefanescu, B. E. (2019b). A New Generation of Probiotic Functional Beverages Using Bioactive Compounds From Agro-Industrial Waste. *Functional and Medicinal Beverages: Volume 11: The Science of Beverages*, 483–528. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816397-9.00015-7>
- Wen Fang Wu Wu, J. (2016). Caracterización de bacterias lácticas en subproductos industriales

de piña (*Anana cosmosus* L. Merr) y determinación de su capacidad de potencial probiótico en jugo de piña. Universidad de Costa Rica.

Widyaningsih, A., Setiyani, O., Umaroh, U., Sofro, M. A. U., & Amri, F. (2017). Effect of Consuming Red Dragon Fruit (*Hylocereus Costaricensis*) Juice on the Levels of Hemoglobin and Erythrocyte Among Pregnant Women. *Belitung Nursing Journal*, 3(3), 255–264. <https://doi.org/10.33546/bnj.97>

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004107/CITE/REFWORKS>

9. Anexos



Figura 4. Inversión en caliente del jugo de pitahaya durante tratamiento térmico.

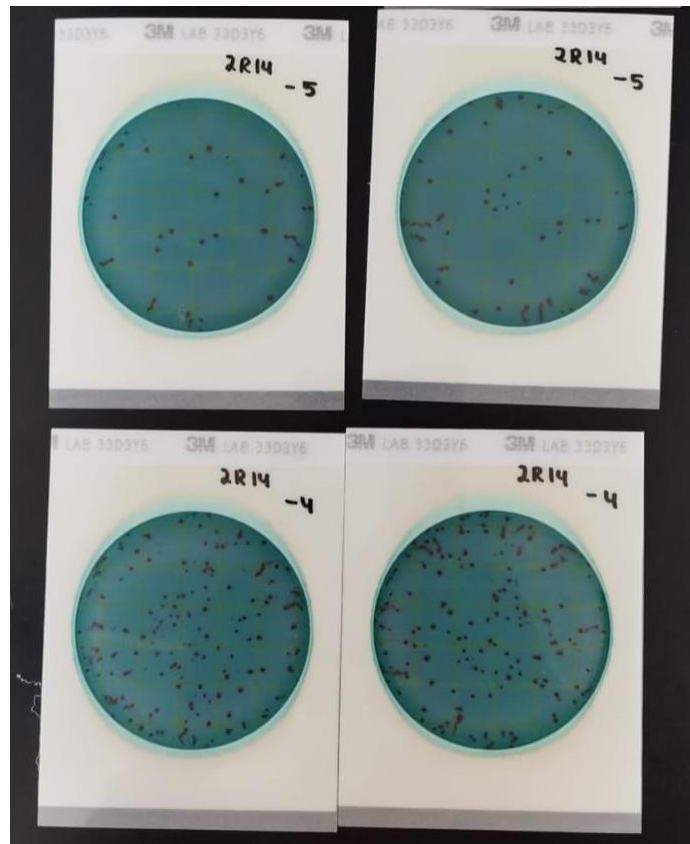


Figura 5. Recuento de las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} de *L. rhamnosus* LGG® en el día 14 de la segunda repetición del objetivo 2.



Figura 6. Microfiltración del jugo de pitahaya con filtro de $0,2\ \mu\text{m}$ en viales para análisis de betalaínas en HPLC.